

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS GEOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**El análisis del colágeno (I), histomorfometría y morfometría
geométrica de los gonfoteridos (Mammalia:
Gomphotheriidae) de América: implicaciones taxonómicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Omar Patricio Recabarren Jara

DIRECTORES

Nuria García García

Michael Buckley

Mario Pino Quivira

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS GEOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**El análisis del colágeno (I), histomorfometría y morfometría
geométrica de los gonfoteridos (Mammalia: Gomphotheriidae) de
América: implicaciones taxonómicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Omar Patricio Recabarren Jara

Directores

Nuria García
Michael Buckley
Mario Pino

© Omar P. Recabarren Jara, 2019

Madrid, septiembre de 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D. Omar Patricio Recabarren Jara, estudiante en el Programa de Doctorado de Geología e Ingeniería Geológica, de la Facultad de Ciencias Geológicas de la Universidad Complutense de Madrid, como autor de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

El análisis del colágeno (I), histomorfometría y morfometría geométrica de los gonfoteridos (Mammalia: Gomphotheriidae) de América: implicaciones taxonómicas

y dirigida por: Nuria García, Michael Buckley y Mario Pino.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 9 de septiembre de 2019.

Fdo.:

Esta tesis ha sido financiada gracias a una beca predoctoral del programa de Becas Chile, Capital Humano Avanzado, Conicyt, Gobierno de Chile, folio N° 72150064.



Departamento de Geodinámica,
Estratigrafía y Paleontología
Facultad de Ciencias Geológicas
Universidad Complutense de Madrid



**El análisis del colágeno (I), histomorfometría y morfometría
geométrica de los gonfoteridos (Mammalia: Gomphotheriidae) de
América: implicaciones taxonómicas**

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por:

Omar Patricio Recabarren Jara



Departamento de Geodinámica,
Estratigrafía y Paleontología
Facultad de Ciencias Geológicas
Universidad Complutense de Madrid



**El análisis del colágeno (I), histomorfometría y morfometría
geométrica de los gonfoteridos (Mammalia: Gomphotheriidae) de
América: implicaciones taxonómicas**

Memoria para optar al Grado de Doctor presentada por:
Omar Patricio Recabarren Jara

Bajo la dirección de: Dra. Nuria García, Dr. Michael Buckley y Dr. Mario
Pino

VºBº NURIA GARCIA

VºBº MICHAEL BUCKLEY

VºBº MARIO PINO

OMAR P. RECABARREN JARA

Agradecimientos

Quiero empezar estos agradecimientos dando las gracias a mi familia, mi madre Elisa Jara y a mi hermana Cynthia Recabarren ya que, sin ellas, ninguno de mis logros sería posible. A mi suegra Herta Brellenthin y a mis hermanos políticos, Camila Canales y Luis Patricio Canales, por toda su hospitalidad en el final de esta tesis.

Segundo mis agradecimientos a mis tutores, la Dra. Nuria García, por sus acertadas conversaciones y consejos que lograron la finalización de esta tesis, por su ayuda a superar momentos “negros” y que, aunque ella no se haya dado cuenta, ayudaron a alumbrar mi camino justo en el momento preciso. Al Dr. Mike Buckley por su paciencia y generosidad al facilitarme todo su laboratorio para esta tesis, y por tener la calma cuando no lograba entender su acento “mancunian” y vernos en la obligación de entendernos con dibujos o señas. A mi director de tesis de Grado, Máster y ahora Doctorado, el Dr. Mario Pino. Gracias Mario por confiar en mi y en tu insistencia porque persevere en este mundo. Dejarás la huella de un meteorito en el sur de Chile y en todos los laboratorios paleo y los equipos y gente que formaste, enganchándonos con tus clases de Geología tan fuera de lo común y la puerta siempre abierta de tu oficina, en una ciudad tan fría como Valdivia.

Quiero dar infinitas gracias a las personas de todos los museos que me facilitaron, tanto la oportunidad de tomar pedacitos de fósiles, como a los que tuvieron tanta amabilidad para enviarme por correo postal muestras para su análisis: a todos los laboratorios y museos de Chile: el Laboratorio de Paleontología y Laboratorio Periférico de Pilauco de la Universidad Austral de Chile. A Gabriel Peralta, curador del Museo Histórico Municipal de Osorno y del Museo Pleistocénico Parque Chuyaca. Al Dr. Claudio Etcheverry Pizarro del Museo Fonck de Viña del Mar. Al Dr. Miguel Ángel Chapanoff Cerda del Museo Regional de la Araucanía de Temuco. Al Dr. José Luis Brito Montero del Museo de Historia Natural e Histórico de San Antonio. A la Dra. Loredana Rosso Elorriaga del Museo de Historia Natural de Valparaíso. Al Museo Histórico y Antropológico Maurice Van de Maele. Al Museo Municipal de Castro-Chiloé. Al Dr. David Rubilar del Museo de Historia Natural de Chile. Al Dr. Alejandro Kramarz, curador de la parte de Paleontología de Vertebrados del Museo Argentino de Cs. Naturales “Bernardino Rivadavia”. A mi amigo José Luis

Román-Carrión de la Escuela Politécnica Nacional de Quito, Ecuador. A la Dra. Ana Lucía Valerio Zamora y al Dr. Cesár Laurito del Museo Nacional de Costa Rica. A la Dra. Eunice Echeverría, curadora y a don Daniel Aguilar del Museo de Historia Natural de El Salvador. A Don Ricardo Aguilar, curador y a Doña Isabel Orendain del Museo Paleontológico de Guadalajara, "Federico A. Solórzano", México. Al Dr. Spencer Lucas del New Mexico Museum of Natural History and Science, Estados Unidos. Al Dr. Oliver Hampe del Museum Für Naturkunde Berlin, Alemania. A mi amigo Dr. Jorge Carrillo de la Universidad de Zurich, Suiza y a la Dra. Alejandra Rojas de la Universidad Nacional de Montevideo, Uruguay.

Muchas gracias por todos los años vividos en el Departamento de Paleontología de la Universidad Complutense de Madrid, donde aprendí mucho de todos. A Charo, nuestra súper secretaria, Isabel Orendain por hacer las láminas delgadas para este estudio, a todos los profesores por sus momentos de conversaciones en los pasillos; Paloma Sevilla, Fernando García Joral, Sixto Fernández López (casi nos adopta los primeros años del Máster), Juan Carlos Gutiérrez-Marco, M^a Luisa Canales Fernández, Elena Moreno González de Eiris, Graciela Sarmiento, a Lidia Bartolomé (quien nos soluciona la vida en el Máster y Doctorado) y a todos los profesores y personal que hicieron tan grata nuestra estadía ahí.

A mis compañeros y amigos del doctorado: Roselis Salazar (y a Cesar su marido), Omid Fesharaki, Jonathan Pelegrin, Meli Berrocal, Iris Menéndez y Ricardo Carvalho por su buena onda y siempre gratas conversaciones.

A mi compañera de penas, alegrías y de la vida, quien me ha soportado por más de diez años, por creer en esta aventura y embarcarse en ella juntos los dos, Patricia Canales.

¡A todos mis infinitas gracias!

ÍNDICE	Páginas
Abstract	1
Resumen	5
1- Introducción	11
1.1- <u>El orden Proboscidea Illiger, 1811</u>	13
1.1.1- <i>Evolución y radiación de los proboscídeos</i>	14
1.2- <u>Los proboscídeos en América</u>	27
1.2.1- <i>La familia Gomphotheriidae Hay (1922)</i>	28
1.2.2- <i>Los géneros Cuvieronius, Haplomastodon, Stegomastodon y Notiomastodon en América</i>	29
1.3- <u>Problemática de los gonfoterios en América del Sur</u>	38
2- Objetivo de la tesis	45
2.1- <u>Objetivo general</u>	47
3- Antecedentes	49
3.1- <u>Introducción</u>	51
3.2- <u>Paleontología molecular</u>	51
3.2.1- <i>Los ácidos nucleicos</i>	53
3.2.2- <i>Las proteínas</i>	54
3.2.3- <i>Las proteínas fósiles</i>	55
3.2.4- <i>El colágeno</i>	56
3.2.5- <i>El colágeno del hueso, el colágeno (I)</i>	57
3.2.6- <i>Técnica de obtención de la huella del colágeno (I)</i>	59
3.2.7- <i>El espectrómetro de masa MALDI-TOF</i>	61
3.3- <u>Histomorfometría ósea</u>	66
3.3.1- <i>La estructura ósea</i>	67
3.3.2- <i>El hueso compacto, osteón y canal de Havers</i>	69
3.4- <u>Morfometría geométrica</u>	74
3.4.1- <i>Tipos de landmarks</i>	77
3.4.2- <i>Configuración de Consenso, Superposición de Procrustes y Distancia de Procrustes</i>	80
4- El material y técnica usada para el análisis	85
4.1- <u>Introducción al material de estudio</u>	87
4.2- <u>Análisis del colágeno (I) por espectrometría de masa</u>	88
4.2.1- <i>Muestras analizadas</i>	88
4.2.2- <i>Técnica a emplear</i>	91
4.3- <u>Histomorfometría de los canales de Havers y osteonas</u>	96
4.3.1- <i>Muestras usadas</i>	96
4.3.2- <i>Técnica a emplear</i>	97
4.3.2.1- <i>Toma de las mediciones</i>	97
4.3.2.2- <i>Manejo de los datos</i>	100

4.4- <u>Morfometría geométrica</u>	100
4.4.1- <i>Muestras usadas</i>	100
4.4.2- <i>Técnica a emplear</i>	103
5- El estudio molecular del colágeno (I) de los gonfoterios de América	109
5.1- <u>Introducción</u>	111
5.2- <u>Objetivo del estudio</u>	112
5.3- <u>Resultados</u>	112
5.4- <u>Discusión</u>	115
6- Diferenciación de grupos por medio de histomorfometría en fósiles de gonfoterios americanos	119
6.1- <u>Introducción</u>	121
6.2- <u>Objetivo de estudio</u>	122
6.3- <u>Resultados</u>	122
6.3.1- <i>Análisis de la varianza de las medias</i>	137
6.3.1.1- <i>Área del osteón</i>	137
6.3.1.2- <i>Perímetro del osteón</i>	138
6.3.1.3- <i>Diámetro del osteón</i>	139
6.3.1.4- <i>Área del canal de Havers</i>	140
6.3.1.5- <i>Perímetro del canal de Havers</i>	141
6.3.1.6- <i>Diámetro del canal de Havers</i>	142
6.3.1.7- <i>Distancia entre los canales de Havers</i>	143
6.4- <u>Discusión</u>	145
7- Morfometría geométrica en la superficie oclusal de molares de gonfoterio americano: <i>Cuvieronius hyodon</i>, <i>Cuvieronius tropicus</i>, <i>Notiomastodon platensis</i> y <i>Stegomastodon</i> sp.	149
7.1- <u>Introducción</u>	151
7.2- <u>Objetivo del estudio</u>	152
7.3- <u>Resultados</u>	152
7.4- <u>Discusión</u>	169
8- Conclusiones	173
8.1- <u>Colágeno</u>	175
8.2- <u>Histomorfometría</u>	176
8.3- <u>Morfometría geométrica</u>	177
8.4- <u>Objetivos futuros</u>	178
9- Bibliografía	181
10- Anexos	222
10.1- <u>Anexo I</u>	224

10.2- <u>Anexo II</u>	234
10.3- <u>Anexo III</u>	242

234
242



ABSTRACT

Introduction and methodology

Taxonomy has always generated discussion and controversy due to the difficulty of separating, in some cases, groups of animals very related or with very close ancestors. This is much more complex and difficult, when they are animals that no longer exist and of which only their fossils remain. This thesis intends to be of help to contribute in the discussion of the classification of the American gomphotheres, by means of the use of three techniques of analysis of the fossil material: the collagen spectrum (I), Histomorphometry by means of thin plates and Geometric Morphometry of the lower third molars.

Objectives

General: The main objective is: to establish a new characterization of American gomphotheres through collagen (I), morphohistology and its morphogeometric attributes, and to incorporate new characteristics to the diagnosis of American gomphotheres.

Specifics:

Collagen (I) analysis: to obtain collagen (I) from American gomphotheres samples and to identify differences and similarities between the different collagen (I) positive spectra of the American gomphotheres samples.

Histomorphometry: to achieve a clear differentiation by means of measurements and statistics, through the study of the microscopic structures of the fossil bones



of the *Cuvieronius hyodon*, *Stegomastodon platensis* and *Notiomastodon platensis* gomphotheres. In addition, to evaluate the use of fossils of different anatomical parts, to discriminate taxa by histomorphometric analysis of them.

Geometrical morphometry: to recognize, through geometrical morphometry, with the m3 (right and left), differences or similarities between the American gomphotheres. To obtain a morphogeometric identification, by means of the selected landmarks and semilandmarks. To evaluate the variability of the m3 (right and left) of the american gomphotheres. Finally, to support or refute the current groupings and classifications of the Gomphotheriidae family in America.

Results and conclusions

Collagen (I) analysis: of the 70 samples used for this research, it was only possible to have 13 samples with successful results in obtaining a collagen (I) footprint, all from Chile. Due to this, it was not possible to contribute new characteristics to the already investigated on the sequence of the collagen (I) of the american gomphotheres and, especially, of the south of Chile. Although it was only possible to obtain spectra of collagen (I) in samples from Chile, this denotes the natural reservoir for macromolecules in the central and southern parts of the country. This provides an important component for future studies, with macromolecules, in fossil remains of the Chilean Quaternary.

Histomorphometry: The internal architecture of fossil bones could be a very important aid when classifying a fossil in a taxonomic range. Although, in this



study, it was not possible to give a classificatory value to any of the metric variables. Whether jaws have the potential to be used as a reference and histological diagnostic attribute. The confrontation between the results of different skeletal elements and their internal structure produced differences. These differences can be due to the architectural constitution of the fossils of different bones and not due to differences in the area of the osteons, perimeter of the osteons, area of the Havers canal, etc.

As a first approximation to the metric study of secondary osteons and Havers channels, in American gomphotheres, it is important to highlight the possibilities that fossils have when they are well preserved and allow the collection of data and uses of their structures. there are few related works, and most of them are made with fresh bones or with existing animals, this study is important because it is the first research of its kind and is important for the real possibilities in its execution with fossil material.

Geometric morphometry: the analysis of the lower third molars (m3) right and left, did not have a differentiation in the Analysis of Principal Components, but it was successful in the Analysis of Canonical Variances. This was a positive result and an achievement of the analysis, we have to have considerations with the result, because the indicators did not have absolute certainties. Therefore, these results must be interpreted with care. Despite this, results never before seen in morphometric analyzes with the m3 were obtained. Due to these new alternatives of analytical uses, it is advisable to continue investigating the variants and new perspectives that can provide other forms of analysis of morphological variations of the anatomical elements most commonly found in a paleontological site, such as molars.



It should be recommended to increase the number of individuals or samples, as well as to add other areas of the skeleton, which serve to corroborate or refute what is known so far with this thesis.



RESUMEN

Introducción y metodologías

La taxonomía siempre ha generado debate y controversias debido a lo difícil de separar, en algunos casos, grupos de animales muy emparentados o con ancestros muy cercanos. Es mucho más complejo y difícil, cuando se trata de animales que ya no existen y de los cuales solo quedan sus fósiles. Esta tesis pretende ser de ayuda para aportar en la discusión de la clasificación de los gonfoterios americanos, mediante el uso de tres técnicas de análisis del material fósil: espectro del colágeno (I), histomorfometría por medio de láminas delgadas y morfometría geométrica de los terceros molares inferiores.

Objetivos

General: El objetivo principal es: establecer una nueva caracterización de los gonfoterios de América, mediante el colágeno (I), la morfohistología y sus atributos morfogeométricos e incorporar nuevas características a las diagnosis de los gonfoterios americanos.

Específicos:

Análisis del colágeno (I): obtener colágeno (I) de las muestras de gonfoterios de América e identificar diferencias y similitudes, entre los diferentes espectros positivos al colágeno (I) de las gonfoterios americanos.



Histomorfometría: conseguir una clara diferenciación por medio de las medidas y la estadística, mediante el estudio de las estructuras microscópicas de los huesos fósiles de los gonfoterios *Cuvieronius hyodon*, *Stegomastodon platensis* y *Notiomastodon platensis*. Además, evaluar la utilización de fósiles de distintas partes anatómicas, para discriminar taxones mediante el análisis histomorfométrico de ellos.

Morfometría geométrica: reconocer, a través de la morfometría geométrica, con los m3 (derecho e izquierdo), diferencias o semejanzas entre los taxones de gonfoterios americanos. Conseguir una identificación morfogeométrica, por medio de los landmarks y semi-landmarks seleccionados. Evaluar la variabilidad de los m3 (derechos e izquierdo) de los gonfoterios americanos. Finalmente, apoyar o refutar, las actuales agrupaciones y clasificaciones de la familia Gomphotheriidae en América.

Resultados y conclusiones

Análisis del colágeno (I): de las 70 muestras usadas para esta investigación, solo fue posible contar con 13 muestras con resultados exitosos en la obtención de una huella del colágeno (I), todas de Chile. Debido a esto, no fue posible aportar nuevas características a lo ya investigado sobre la secuencia del colágeno (I) de los gonfoterios americanos y, sobre todo, del sur de Chile. Aunque solo fue posible la obtención de espectros del colágeno (I), en las muestras de Chile, esto denota el reservorio natural para macromoléculas de la zona centro y sur del país.



Lo que otorga un componente importante para futuros estudios, con macromoléculas, en restos fósiles del Cuaternario chileno.

Histomorfometría: potencialmente la arquitectura interna de los huesos fósiles podría ser una ayuda bastante importante al momento de clasificar un fósil en un rango taxonómico. A pesar de que, en este estudio, no fue posible de forma concluyente, otorgarle un valor clasificatorio a alguna de las variables métricas. Si se observa la potencialidad que tienen las mandíbulas. La confrontación entre los resultados de elementos esqueléticos distintos y su estructura interna, produjo diferencias. Estas diferencias probablemente sean por la constitución arquitectónica de los fósiles de huesos distintos y no por diferencias del área de las osteonas, perímetro de las osteonas, área del canal de Havers, etc.

Como primera aproximación al estudio métrico de las osteonas secundarias y canales de Havers en gonfoterios de América, cabe destacar las posibilidades que se tienen y barajan cuando los fósiles presentan una buena conservación, capaz de permitir la adecuada toma de datos y usos de sus estructuras. Dada la poca cantidad de trabajos relacionados y a que la mayoría de estos son hechos con material fresco o con animales existentes, este se transforma en una de las primeras investigaciones en su género y se destaca por las reales posibilidades en su ejecución con material fósil.

Morfometría geométrica: Los análisis de los terceros molares inferiores (m3) derecho e izquierdo, no tuvieron una clara diferenciación en los Análisis de Componentes Principales, pero si fue lograda en el Análisis de Varianzas Canónica. A pesar de que esto fue un resultado positivo, hay que tener



consideraciones, debido a que los indicadores no arrojaron certezas absolutas. Por lo cual, estos resultados deben ser interpretados con cuidado. A pesar de esto, se obtuvieron resultados nunca antes vistos en análisis morfométricos con los m3 de gonfoterio. Debido a estas nuevas alternativas de usos analíticos, es recomendable seguir investigando nuevas perspectivas que puedan entregar otras formas de análisis de variaciones morfológicas de los elementos anatómicos más comúnmente hallados en un yacimiento paleontológico, como son los molares.

Cabría recomendar aumentar el número de individuos o muestras, así como agregar otras zonas del esqueleto, que sirvan para corroborar o refutar lo que se sabe hasta el momento con esta tesis.

1- INTRODUCCIÓN



1.1-El orden Proboscidea Illigeri, 1811

Por su tamaño y abundancia en yacimientos superficiales, los fósiles fueron los primeros en atraer la atención humana y ser estudiados de manera científica (siglo XVIII) (Simpson, 1945).

Los proboscídeos son un grupo de animales euterios cuya característica más distinguible es el labio superior y la nariz fusionados en una estructura llamada trompa (Paula-Couto, 1979; Shoshani, 1998). Ellos antiguamente eran conocidos como Paquidermos (Cuvier, 1817). Las características propias del grupo incluyen la presencia de grandes defensas, las cuales corresponden a los segundos incisivos proyectados hacia fuera y anterior al maxilar (Cuvier, 1817; Shoshani y Tassy, 1996). En algunos taxones extintos, las defensas estaban presentes en la mandíbula, como en los géneros *Deinotherium* y *Platybelodon* (Shoshani, 1998). Todos los representantes del grupo presentan ausencia del primer premolar y de los caninos, aunque en algunas formas basales están presentes los caninos superiores (Paula-Couto, 1979). En segundo lugar, el radio está ubicado en una posición de pronación y tienen extremidades columnares con apoyo semi-digitígrados, provistos de cinco dedos (Cuvier, 1817; Paula-Couto, 1979; Shoshani y Tassy, 1996; Shoshani, 1998). Finalmente, el esmalte de los molares, presenta en un corte en sección transversal, figuras de prisma *keyhole* típicas del orden (Shoshani, 1998; Tabuce *et al.*, 2007).



1.1.1- Evolución y radiación de los proboscídeos

Revisando su historia evolutiva, los animales clasificados en el orden sufrieron un aumento volumétrico y en algunos casos, se volvieron muy grandes y robustos (Fig. 1.1). Los proboscídeos tuvieron un amplio rango de masa corporal, desde unos pocos kilogramos en los primeros representantes, hasta varias veces más pesados que las formas existentes (e. g., *Palaeoloxodon namadicus* con 22 toneladas y 520 cm de alto) (Larramendi, 2016).

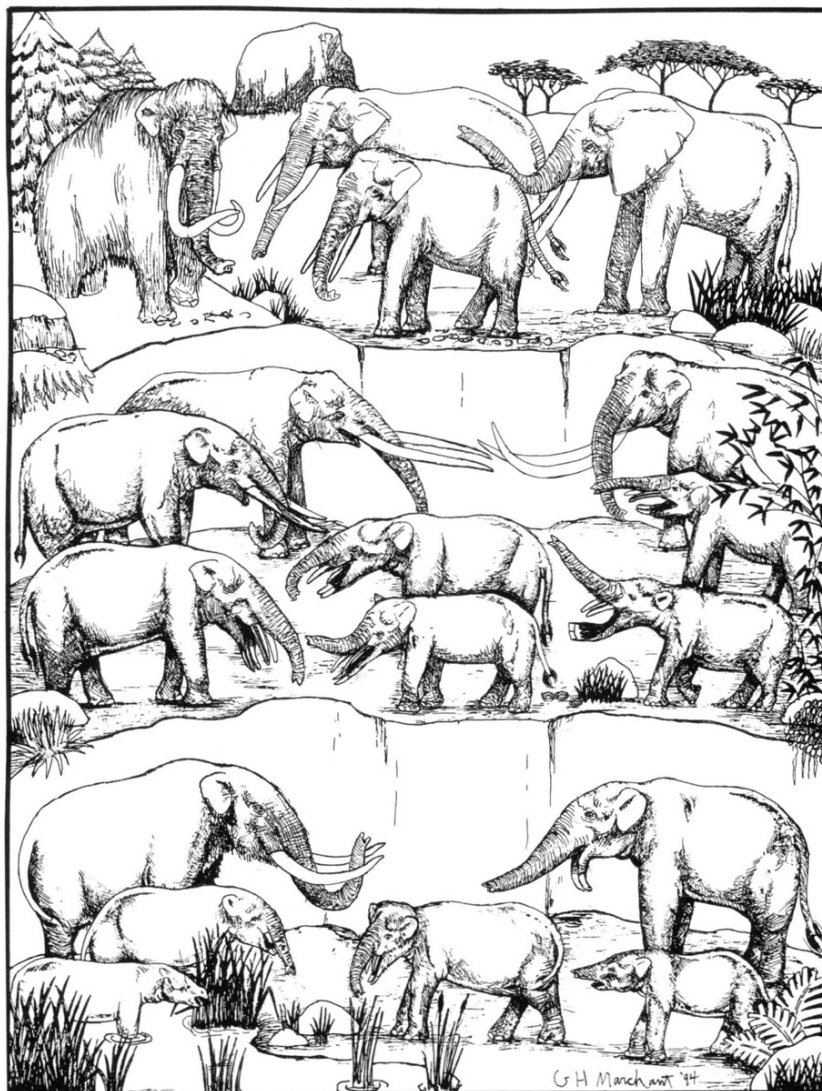


Figura 1.1- El orden Proboscidea (tomada de Shoshani y Tassy, 1996).



Las formas y variaciones morfológicas del cráneo y defensas, entre las diferentes familias, tuvieron enormes transformaciones durante su evolución (Fig. 1.2) (Larramendi, 2016). El tejido óseo del cráneo aumentó en neumatización, albergando y protegiendo un cerebro de gran tamaño y la fosa nasal se retrasó, más arriba de las órbitas oculares (Cuvier, 1817; Paula-Couto, 1979; Shoshani y Tassy, 1996; Shoshani, 1998; Shoshani *et al.*, 2006). También la

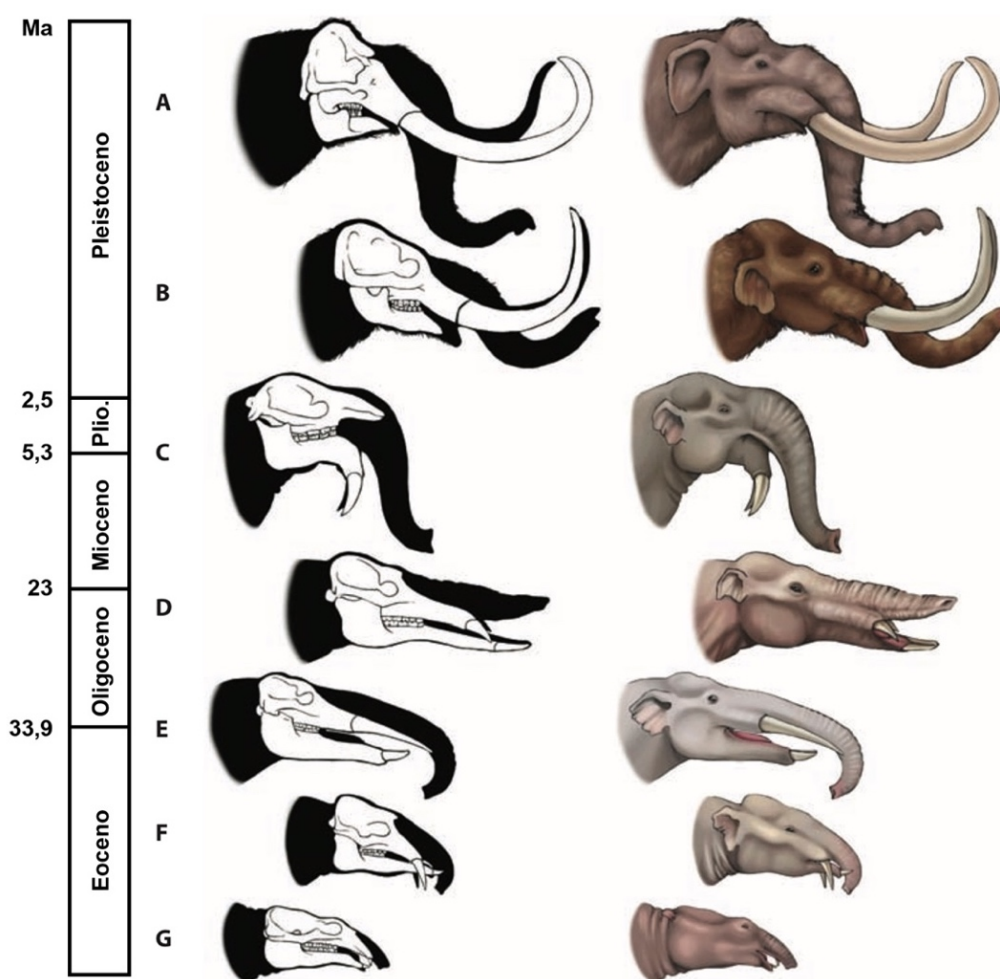


Figura 1.2- Evolución craneal de algunas familias de proboscídeos, desde el Eoceno hasta el Pleistoceno. **A.** *Mammuthus* (Elephantidae), **B.** *Mammuth* (Mammuthidae), **C.** *Deinotherium* (Deinotheriidae), **D.** *Gomphotherium* (Gomphotheriidae), **E.** *Phiomia* (Phiomiidae), **F.** *Palaeomastodon* (Palaeomastodontidae) y **G.** *Moeritherium* (Moeritheriidae) (modificado de Prothero, 2017).



superficie oclusal de sus molares tendió a la complejidad, aumentando el número de placas y lofos (Shoshani, 1998) (Fig. 1.3). Estos elementos se usan, hoy en día, para diferenciar a los principales grupos de proboscídeos (como mastodontes, gonfoterios y elefantes) (Haynes, 1991). Estas características se pueden considerar como sinapomorfías del grupo, ya que los fósiles de proboscídeos más basales del Paleógeno no las poseían, es el caso de *Eritherium* y *Phosphatherium* (Gheerbrant *et al.*, 1996; Shoshani, 1998; Gheerbrant, 2009; Prothero, 2017).

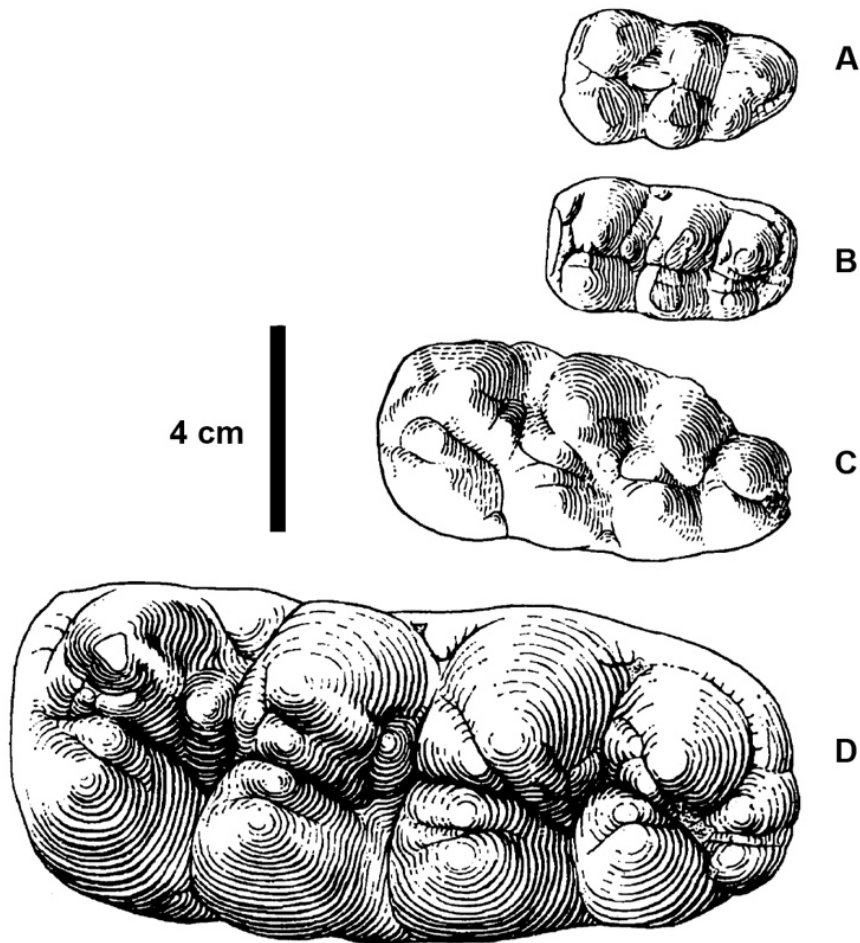


Figura 1.3- Ejemplo de cuatro terceros molares inferiores (m3) de proboscídeos primitivos. **A.** *Palaeomastodon beadnelli*, **B.** *Phiomia serridens*, **C.** *Eritreum melakeghebrekrystosi*, **D.** *Gomphotherium sylvaticum* (modificado de Gheerbrant y Tassy, 2009).



Los fósiles de estos géneros presentan incisivos largos pero que no constituyen verdaderas defensas, un cráneo alargado y comprimido dorso ventralmente y es posible que no presentaran una probóscide verdadera (Shoshani, 1998; Tassy y Shoshani, 1996). *Eritherium* es considerado el pariente más antiguo de los proboscídeos (Gheerbrant, 2009; Gheerbrant *et al.*, 2012; Prothero, 2017). Los registros lo remontan al Paleoceno tardío (60 Ma) de Marruecos (Gheerbrant *et al.*, 2012; Prothero, 2017). Sus molares tienen cuatro cúspides redondeadas, con solo un indicio del patrón de la cresta cruzada que se ve en los proboscídeos siguientes (Gheerbrant *et al.*, 2012; Prothero, 2017). Del Eoceno temprano (55 Ma) se registra a *Phosphatherium*, un animal con características mucho más cercanas a los proboscídeos, que incluye molares con crestas cruzadas mucho más marcadas que en el caso de *Eritherium* (Gheerbrant *et al.*, 1996; Gheerbrant y Tassy, 2009; Prothero, 2017).

Los proboscídeos colonizaron casi todos los hábitats continentales como pantanos, tundras, bosques, desiertos, sabanas y alta montaña (Shoshani, 1998). Se adaptaron morfológica y fisiológicamente a las exigencias del medio y sus fósiles se encuentran en todos los continentes con excepción de la Antártida y Australia (Shoshani, 1998; Lambert y Shoshani, 1998; Sukumar, 2003).

Dentro de la sistemática de los proboscídeos, estos están incluidos en un clado llamado Paenungulata, descrito por primera vez por Simpson (1945). Actualmente este grupo es también soportado como válido gracias a los estudios en filogenia molecular (de Jong, 1998; Murphy *et al.*, 2004). Paenungulata contiene a los órdenes: Proboscidea, Sirenia e Hyracoidea (Porter *et al.*, 1996; de Jong, 1998; Kellogg *et al.*, 2007; Benoit *et al.*, 2015), aunque algunos autores apuntan una estrecha relación de Hyracoidea con Perisodáctila (Fischer, 1989; Prothero y Schoch, 1989; Porter *et al.*, 1996). Los Paenungulata contienen sólo una docena de especies, actualmente entre ellos los más grandes mamíferos terrestres, que



incluye: las tres especies de elefantes actuales, cuatro especies de mamíferos herbívoros acuáticos, dugongos y manatíes (Sirenia) y cinco especies de damanes (Hyracoidea) (Svartman y Stanyon, 2012). Paenungulata es jerarquizado por Afrotheria, un grupo con poco soporte morfológico y paleontológico, que fue definido enteramente en base a análisis moleculares (secuencias de ARN y ADN) como un grupo monofilético (Stanhope *et al.*, 1998a; 1998b; Svartman y Stanyon, 2012; Prothero, 2017). Afrotheria es un clado superorden endémico de África, que incluye a los órdenes Proboscídea, Sirenia, Hyracoidea, Macroscelidea, Tubulidentata y Afrosoricida (Stanhope *et al.*, 1998b; Roca y O'Brien, 2005; Svartman y Stanyon, 2012) (Fig. 1.4). Los estudios moleculares sugieren que este superorden se originó en el Cretácico, alrededor de 145 millones de años atrás, y que los proboscídeos divergieron en el Paleoceno temprano. Esta separación tuvo una rápida expansión en los comienzos del Eoceno, hace 56 millones de años aproximadamente (Sukumar, 2003; Sanders *et al.*, 2010).

En el Eoceno de África, los ancestros de los proboscídeos tenían una vida semiacuática (Liu *et al.*, 2008; Gheerbrant *et al.*, 2012), como *Moeritherium* un género de proboscídeo basal (Delmer *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Sanders *et al.*, 2010). El tamaño y la apariencia física de los representantes de este género, eran semejantes a la de un cerdo actual (Haynes, 1991; Sukumar, 2003; Liu *et al.*, 2008).

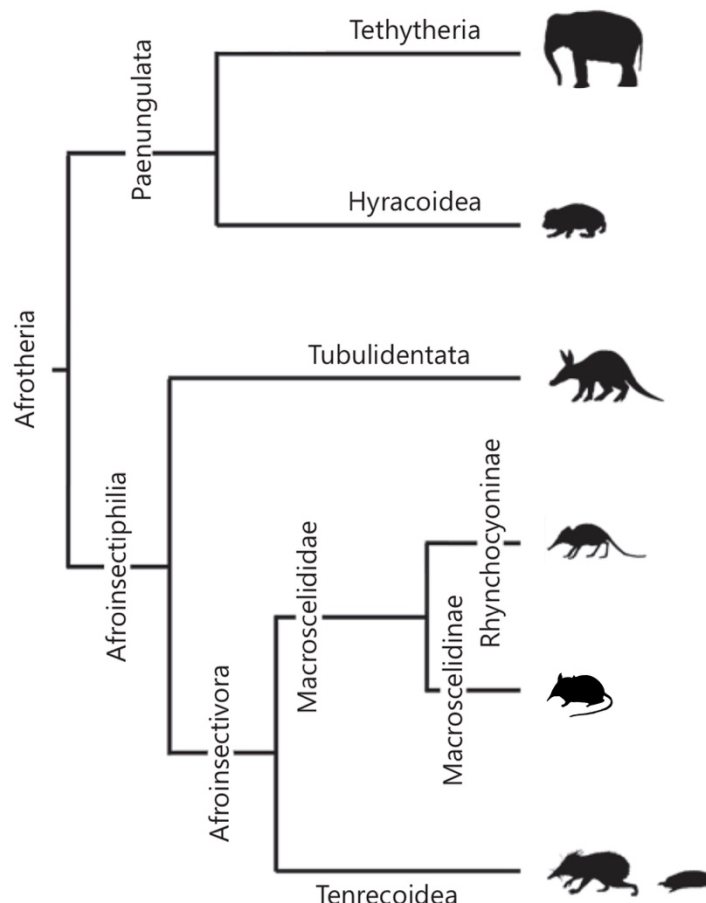


Figura 1.4- Árbol filogenético de Afrotheria. Tethytheria incluye a sirenios y proboscídeos (modificado de Benoit *et al.*, 2013).

Desde sus orígenes, los proboscídeos, evolucionaron de animales de talla pequeña (*e.g.*, *Moeritherium*, Fig. 1.5) hasta los actuales elefantes como *Loxodonta africana* (elefante africano de sabana), *Loxodonta cyclotis* (elefante africano de bosque) y *Elephas maximus* (elefante asiático), los cuales son los mamíferos terrestres más grandes en la actualidad (Shoshani, 1998; Shoshani y Tassy, 1996; Sanders *et al.*, 2010) (Fig. 1.6). Todos ellos componen la familia Elephantidae, el único taxón sobreviviente (Biaza, 2006).

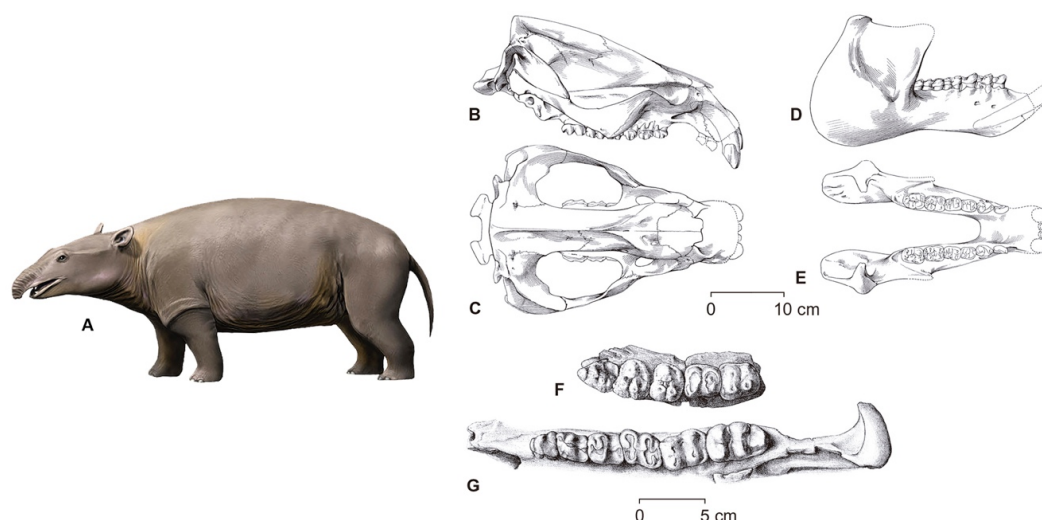


Figura 1.5- Aspectos morfológicos del género *Moeritherium*. **A.** reconstrucción de *Moeritherium* en vida. Cráneo de *Moeritherium trigodon*. **B.** vista lateral, **C.** vista dorsal. Mandíbula de *Moeritherium trigodon*. **D.** vista lateral, **E.** vista dorsal. **F.** molares P2-M2 en vista oclusal, **G.** dentario izquierdo con p2-m3 en vista oclusal. (Figura: A, hecha por Nobumichi Tamura y tomada de www.fineartamerica.com. Figuras B, C, D, E, F y G, modificadas de Osborn, 1936; Andrews, 1906 y Sanders *et al.*, 2010).

Otra particularidad de los proboscídeos, es la forma en la cual emergen y son reemplazados sus molares. Estos son reemplazados uno a la vez, hasta llegar al M3/m3 (molares finales, dos superiores “M” y dos inferiores “m”). Los molares que van emergiendo, empujan a los anteriores al estilo de una cinta transportadora. Los elefantes actuales, a lo largo de su vida, tienen seis molares por hemimaxilar y hemimandíbula (tres premolares y tres molares), lo que sumado a los dos incisivos superiores que constituyen las defensas, hacen un total de veintiséis piezas dentales (Shoshani y Tassy, 1996).

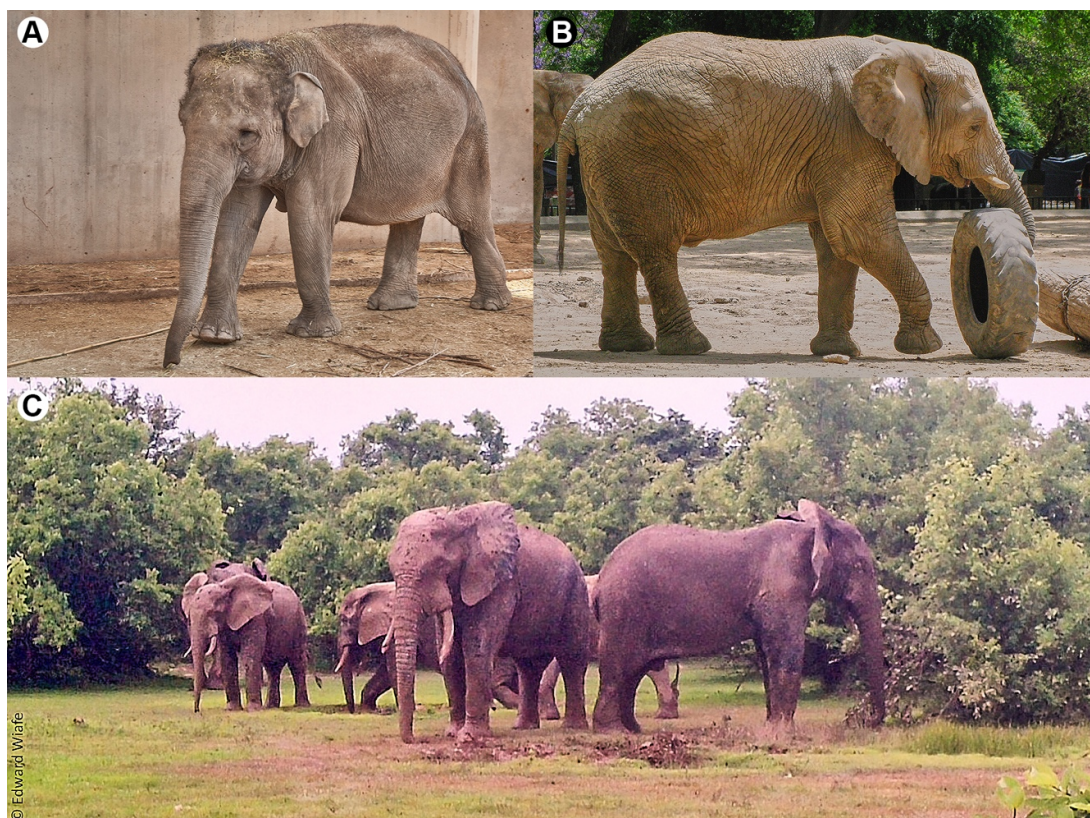


Figura 1.6- Proboscídeos actuales. **A.** *Elephas maximus* (Zoológico de Madrid, España), **B.** *Loxodonta africana* (Zoológico de La Plata, Argentina) y **C.** *Loxodonta cyclotis*. Fotografías **A.** y **B.** son propiedad del autor de esta tesis; **C.** tomada de Danquah y Oppong (2014).

Respecto a la probóscide, estructura común a todos los miembros del orden, esta funciona como un órgano prensil para tomar objetos. Poseen tal nivel de destreza, que los actuales elefantes son capaces de separar tallos individuales de hierba, como también levantar objetos muy pesados con ella. También la ocupan para llevar agua a la boca. Al comienzo, los autores que estudiaron la evolución del grupo, consideraron que la probóscide era producto de evolución paralela en los diferentes taxones del orden Proboscidea. Sin embargo, en la actualidad se conoce que esto es el legado de un antepasado en común a todos los proboscídeos (Haynes, 1991).



Respecto a la movilidad y rangos biogeográficos del grupo, se conocen tres grandes radiaciones del orden Proboscidea:

- Primera radiación:

Según Shoshani *et al.* (1996), los primeros proboscídeos se agrupan en tres familias: Moeritheridae, Barytheriidae y Deinotheriidae. Los fósiles de Moeritheridae y Barytheriidae están registrados en el límite Eoceno-Oligoceno de África, en yacimientos a las orillas del Mar de Tethys. Los restos de Deinotheriidae (*Prodeinotherium* y *Deinotherium*), se han registrado en África, Asia y Europa, en sedimentos que van desde el Mioceno hasta el Pleistoceno. Sin embargo, Shoshani *et al.* (1996) mencionan la alta probabilidad de que *Deinotherium* pudiera ser encontrado en unidades más antiguas.

Esta dispersión también involucró a los proboscídeos con molares tipo zygodontos, cuyos lofos o lófidos se unen de manera transversal simple, continua y sin cónulos (Tobien, 1996). Son tres géneros los más destacados: *Eozygodon* del Mioceno temprano de África, *Zygodon* del Mioceno medio de Eurasia y América del Norte y *Mammuth* del Mioceno tardío, cuyo último se dispersó a Eurasia y América del Norte (Tobien, 1996). La familia Mammuthidae no sufrió grandes cambios en los 20 millones de años de evolución, solo son apreciables pequeñas variaciones dentales entre las especies del rango Mioceno temprano - Pleistoceno tardío (Tobien, 1996).



- Segunda radiación:

La familia Gomphotheriidae son los principales protagonistas. Esta familia tuvo una gran radiación durante el Mioceno temprano (~20 Ma), la cual incluyó África del este y Eurasia (Shoshani y Tassy, 1996; Sukumar, 2003; Sanders *et al.*, 2010). El registro de esta es utilizado para definir el *Proboscidean Datum Event* (Mazo, 1996; Tassy, 1996). Los gonfoterios persistieron en África hasta el Plioceno - Pleistoceno, y sus registros en Eurasia han sido referidos para el Mioceno tardío (Shoshani y Tassy, 1996).

En Asia, los restos más antiguos de *Gomphotherium* se conocen para el Mioceno medio / inferior de China y en el Mioceno temprano de Pakistán (Tassy, 1996). El registro de gonfoterio en América del Norte se conoce desde el Mioceno medio hasta el final del Pleistoceno (Lambert, 1996). En contraste, Gomphotheriidae ha sido reportado para América del Sur desde el Pleistoceno temprano (Alberdi *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2005); aunque algunos registros dudosos sugieren la presencia del grupo en rocas del Mioceno de la región amazónica (Campbell *et al.*, 2002). Se registran dos géneros, *Cuvieronius* y *Stegomastodon*, aunque la validez taxonómica de este último ha estado en disputa en los últimos años, siendo recientemente atribuido al género *Notiomastodon* (Mothé *et al.*, 2012; 2013).

La primera oleada de elefantes africanos hacia Eurasia, probablemente fueron integradas por el género *Stegodon* hace 5 Ma aproximadamente, lo que pudo ser facilitado por los bajos niveles del mar Mediterráneo. Los géneros *Stegodon* y *Stegolophodon* pudieron coexistir en el sur de Asia, contando con registros de *Stegodon* hasta el Pleistoceno de Asia. *Elephas*, aparentemente, fue el primer



género que emigró hacia Eurasia en el Plioceno medio, seguido por *Mammuthus* y *Loxodonta* (Kalb *et al.*, 1996).

El género *Primelephas*, así como los primeros miembros del género *Loxodonta*, habitaron África en el Mioceno tardío/Plioceno temprano (Kalb *et al.*, 1996). Los géneros *Mammuthus* y *Elephas* (incluido *Palaeoloxodon*), han sido registrados desde el Plioceno temprano africano (Gheerbrant y Tassy, 2009).

- Tercera radiación:

La familia Elephantidae es la que representa la última mayor radiación. Emigraron a todas partes del mundo, con excepción de la Antártida, Australia y América del Sur (Todd y Roth, 1996). De esta familia, el género *Mammuthus* hizo su primera aparición en Eurasia en el Plioceno tardío, persistiendo hasta el final del Pleistoceno (Lister, 1996). Maglio (1973) menciona que, en el inicio, la familia Elephantidae tuvo una baja diversidad, las nuevas especies aparecieron rápidamente y las tasas de extinción fueron muy bajas. En el Plioceno tardío hasta el Pleistoceno temprano, los Elephantidae se expandieron por un amplio rango geográfico. El cambio morfológico fue lento y casi no hubo extinción de taxones. La segunda gran fase de evolución de la familia, se llevó a cabo en el Pleistoceno Medio. Su especiación como su evolución filética tuvieron una rápida aceleración, especialmente en los géneros *Elephas* y *Mammuthus*, producto de un gran cambio climático (Maglio, 1973). En el Pleistoceno la extinción de especies de la familia Elephantidae aumentó, manteniéndose en alrededor de ocho especies (Maglio, 1973).



En América del Norte *Mammuthus* se conoce desde 1,7 Ma. Los mamuts evolucionan de manera independiente en el Viejo y Nuevo Mundo, dando formas terminales muy grandes en América como *Mammuthus columbi* (420 cm de alto y 12,5 toneladas) y otras más pequeñas en Asia, como el *Mammuthus primigenius* de Siberia (267 cm de alto y 3.9 toneladas) (Gheerbrant y Tassy, 2009; Larramendi, 2016).

Para entender el desplazamiento de los miembros del orden Proboscidea y las especies que se originaron en los distintos continentes, se adjunta la tabla 1.1, donde se puede ver su registro geológico.



Taxón	Registro geológico												Continente				
	Pa	Et	Em	Eta	O	Mt	Mm	Mta	Pli	Ple	Ht	Hta	As	Af	Eu	AN	AS
<i>Eritherium</i>	X													X			
<i>Phosphatherium</i>		X												X			
<i>Anthracobune</i>		X	X										X				
<i>Moeritherium</i>			?	X	X									X			
<i>Numidotherium</i>		?	X											X			
<i>Barytherium</i>				X	X									X			
<i>Prodeinotherium</i>						X	X	X					X	X	X		
<i>Deinotherium</i>							X	X	X	X			X	X	X		
<i>Palaeomastodon</i>				X	X									X			
<i>Phiomia</i>				X	X									X			
<i>Hemimastodon</i>						X							X				
<i>Eozygodon</i>						X	X							X			
<i>Zygolophodon</i>						X	X	X	?				X	X	X	X	
<i>Mammut</i>							X	X	X	X	X		X	X	X	X	
<i>Choerolophodon</i>						X	X	X	?				X	X	X		
<i>Gomphotherium</i>						X	X	X	?				X	X	X	X	
<i>Amebelodon</i>							X	X	X				X	X		X	
<i>Platybelodon</i>						X	X	X	?				X	X	X	X	
<i>Serbelodon</i>							X	X					X		?	X	
<i>Protanancus</i>							X	X					X	X			
<i>Archaeobelodon</i>						X	X							X	X		
<i>Gnathabelodon</i>							X	X								X	
<i>Sinomastodon</i>								X	X	X			X				
<i>Eubelodon</i>							X									X	
<i>Rhynchotherium</i>							X	X	X							X	
<i>Stegomastodon</i>									?	X						X	?
<i>Haplomastodon</i>									X	X						?	X
<i>Notiomastodon</i>										X							X
<i>Cuvieronius</i>								?	X	X						X	X
<i>Tetralophodon</i>							X	X	X	?			X	X	X	?	
<i>Anancus</i>								X	X	X			X	X	X		
<i>Paratetralophodon</i>								X					X				
<i>Stegolophodon</i>						X	X	X	X	?			X				
<i>Stegodon</i>								X	X	X	X		X	X	?		
<i>Stegotetrabelodon</i>								X	X				?	X			
<i>Stegodibelodon</i>								X	X					X			
<i>Primelephas</i>								X	X					X			
<i>Loxodonta</i>								X	X	X	X	X		X			
<i>Elephas</i>									X	X	X	X	X	X	X		
<i>Mammuthus</i>									X	X	X		X	X	X	X	

Tabla 1.1- Registro Geológico de algunos géneros de proboscídeos. Siglas: Pa, Paleoceno; Et, Eoceno temprano; Em, Eoceno medio; Eta, Eoceno tardío; O, Oligoceno; Mt, Mioceno temprano; Mm, Mioceno medio; Mta, Mioceno tardío; Pli, Plioceno; Ple, Pleistoceno; Ht, Holoceno temprano; Hta, Holoceno tardío; As, Asia; Af, África; Eu, Europa; AN, América del Norte (Incluye América Central para *Zygolophodon*, *Mammut*, *Rhynchotherium*, *Stegomastodon*, *Cuvieronius* y *Mammuthus*); AS, América del Sur (incluye América Central para *Haplomastodon*). (Tabla modificada de Sukumar, (2003), con información de Gheerbrant *et al.*, 2012 y Gheerbrant y Tassy, 2009).



1.2- Los proboscídeos en América

Los proboscídeos están presentes en América del Norte desde el Mioceno medio (Olsen, 1959; Tedford *et al.*, 1987). Los restos más antiguos, están representados por el género *Zygodolophodon*, el cual se registra desde los 17 Ma (Fariña *et al.*, 2013). Los gonfoterios existen en América del Norte desde el Mioceno medio hasta el final del Pleistoceno (Lambert, 1996). Los Elephantidae migraron entre 1,3 a 1,6 Ma aproximadamente, con representantes del género *Mammuthus* que llegaron desde Eurasia a América del Norte a través del puente de Bering, aunque el género cuenta con escasos registros fósiles atribuidos a esa edad (Lucas y Morgan, 2014).

En el Pleistoceno tardío de América del Norte y América Central, los proboscídeos tuvieron una alta diversidad en un área tan pequeña, como es ese subcontinente. Se registran cuatro géneros diferentes: *Mammut*, *Mammuthus*, *Haplomastodon* y *Cuvieronius*. Todos fueron géneros monoespecíficos, menos *Mammuthus*, con cuatro especies: *M. columbi*, *M. jeffersonii*, *M. primigenius* y *M. exilis* (Graham, 2001; Carrillo-Briceño, 2011).

La diversidad de la familia Gomphotheriidae alcanzó su máximo esplendor en torno a los 10 Ma, con seis géneros: *Gomphotherium*, *Rhynchotherium*, *Amebelodon*, *Serbelodon*, *Platybelodon* y *Torynabelodon*. En los 4 Ma, el registro de gonfoterios se redujo a tres géneros: *Gomphotherium*, *Rhynchotherium* y *Amebelodon*. Después, por sobre los 4 Ma, se vuelven menos comunes, sobreviviendo los géneros: *Rhynchotherium*, *Cuvieronius* y *Stegomastodon*. Los géneros *Rhynchotherium* y *Stegomastodon*, tienen registros hasta el Pleistoceno temprano mientras que *Cuvieronius*, está presente hasta el límite Pleistoceno/Holoceno (Lambert, 1996; Todd y Roth, 1996).



1.2.1- La familia Gomphotheriidae Hay (1922)

En la historia evolutiva de los proboscídeos, la familia con mayor número de taxones, así como registros con una gran extensión geográfica y estratigráfica, fue la familia Gomphotheriidae (Shoshani, 1998). Los gonfoterios, desarrollaron como principales novedades evolutivas el aumento en tamaño de los molares, así como el aumento en número de los lofos/lófidos, en los molares bunodontos o zigodontos (Shoshani y Tassy, 1996; Sukumar, 2003; Sanders *et al.*, 2010). Además, sumaron el cemento y cónulos, en las zonas cercanas a la línea media de los molares (Lambert, 1996; Sanders *et al.*, 2010). Al desgastarse la superficie oclusal (principalmente los lofos/lófidos y cónulos/conúlidos) producto de la masticación, se forma una figura parecida a un trébol (Lambert y Shoshani, 1998) (Fig. 1.7). La fosa nasal se ensanchó en comparación a las otras familias de proboscídeos (Shoshani y Tassy, 1996; Lambert y Shoshani, 1998). También sus defensas crecieron en largo y se diferenciaron en cada taxón (Shoshani y Tassy, 1996; Sanders *et al.*, 2010). En los grupos con defensas en la mandíbula (carácter plesiomórfico), presente en los gonfoterios basales (*e.g.*, *Gomphotherium angustidens*), estas son redondeadas o comprimidas lateralmente (Lambert y Shoshani, 1998). Las defensas inferiores planas, heredados del género *Phiomia* del Oligoceno, son arquetípicos para los primeros linajes elefantoides del Mioceno (Tassy, 1996). La asociación de molares bunodontos simples (primitivos), junto con defensas inferiores con una sección transversal piriforme, sigue siendo el mejor criterio para identificar un gonfoterio primitivo (Tassy, 1996). Tassy (1986), menciona que es bastante complejo caracterizar al grupo por ser parafilético. Este se divide en dos grupos parafiléticos: los tetralofodontos, constituidos por *Stegolophodon* (Asia), *Stegodon* (África) y *Anancus* (Europa), entre otros. Y los trilofodontos, formados por *Sinomastodon* (Asia), *Gomphotherium* (Europa y



América del Norte) y los gonfoterios de América: *Cuvieronius*, *Haplomastodon* y *Stegomastodon* (Gheerbrant y Tassy, 2009).

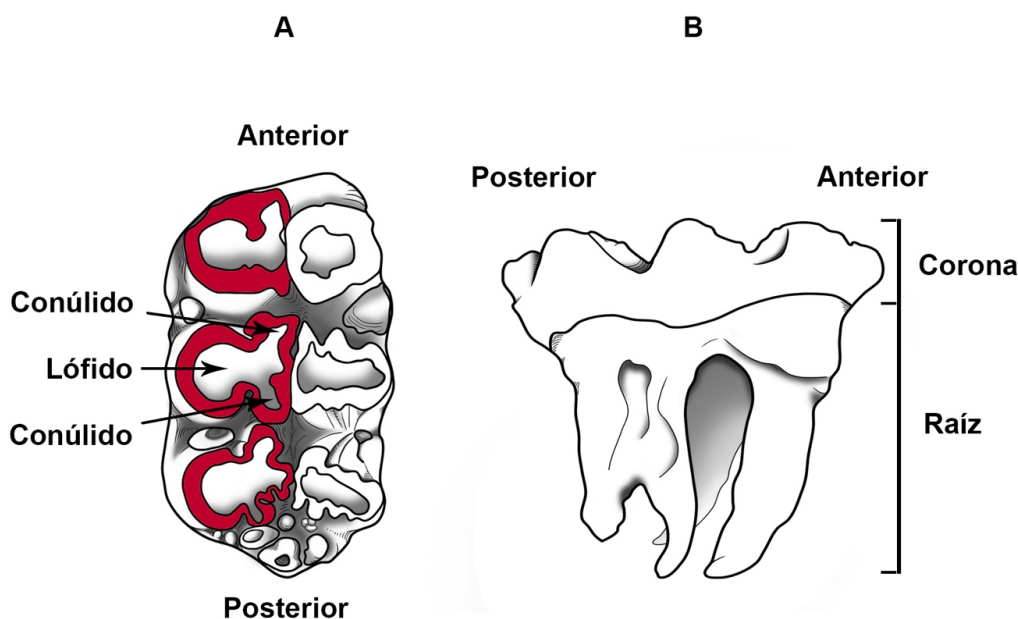


Figura 1.7- Esquema de un segundo molar izquierdo (m2) de gonfoterio. **A.** En vista oclusal. Los conúlidos y lófidos de la región pretrite, al desgastarse, forman la figura de “trébol” (en rojo). **B.** Molar en vista lateral.

1.2.2- Los géneros *Cuvieronius*, *Haplomastodon*, *Stegomastodon* y *Notiomastodon* en América

Los géneros tratados en este apartado, corresponden a los registrados o que han sido mencionados en América del Norte y Sur. Géneros como *Rynchotherium* o *Gomphotherium* con presencia exclusiva en América del Norte, no serán comentados, debido al sentido de esta tesis. El género *Notiomastodon* es la excepción, ya que, a pesar de contar solo con registro exclusivo en América del Sur, la discusión taxonómica se centra en él.



Para llegar a América del Norte, es probable que los gonfoterios usaran el corredor terrestre formado en la región de Bering. En esa zona de contacto entre América y Asia, las edades de los fósiles de gonfoterios fluctúan desde el Mioceno tardío, aproximadamente 13 Ma, hasta el Pleistoceno – Holoceno, 11 mil años atrás (Shoshani y Tassy, 1996). Desde allí se dispersaron hasta llegar a las zonas más australes del continente (Recabarren, 2019).

La llegada de los proboscídeos a América del Sur se produjo hace 3 Ma en el Plioceno medio, se conectaron la zona norte y sur del continente en el Istmo de Panamá (Leigh *et al.*, 2014). Por este puente natural, migraron animales y plantas en ambos sentidos. Este proceso es conocido como el Gran Intercambio Biótico Americano (GIBA) (Leigh *et al.*, 2014). De las tres familias de proboscídeos conocidos en América del Norte; Elephantidae, Mammutidae y Gomphotheriidae, solo esta última ha sido referida para América del Sur (Cabrera, 1930; Hoffstetter, 1950; 1952; Simpson y Paula-Couto, 1957; Haynes, 1991; Prado *et al.*, 2005). Aunque un molar aislado, encontrado en Cayena, en La Guyana Francesa en el siglo XIX, asignado a *Mammuthus columbicayennensis*, junto con los restos de un molar sin identificar proveniente de la amazonia brasileña (con características zigodontas), ratifican que la familia Elephantidae llegó hasta el norte de América del Sur, y que América Central no constituyó el límite más austral para esta familia (Carrillo-Briceño, 2011).

La dispersión de los gonfoterios alcanzo hasta el extremo de América del Sur, con amplios registros desde la región de Osorno (40° 34' S; 73° 07' W), hasta la isla de Chiloé (42° 28' S; 73° 48' W) en el sur de Chile (Recabarren, 2008; 2019; Labarca *et al.*, 2014; Recabarren *et al.*, 2014).

Las descripciones y comentarios para cada género, son las siguientes:



- **Género *Cuvieronius* Osborn, 1923:** es endémico de América, se le conoce desde el Plioceno tardío y persiste en América del Norte, donde tuvo su origen, hasta el fin del Pleistoceno, migrando a América del Sur en el GIBA (Lambert y Shoshani, 1998; Graham, 2001; Leigh *et al.*, 2014).

En América del Norte se han registrado fósiles asignados a *Cuvieronius*, desde México hacia el norte. *Cuvieronius* es conocido, al menos en 12 localidades de Florida, en Estados Unidos (Lucas, 2008). El consenso habitual, era que la especie *Cuvieronius tropicus* se les atribuía a todos esos fósiles registrados desde México hacia el norte, y todos los especímenes de América del Sur a *Cuvieronius hyodon* (Lucas, 2008; Lucas *et al.*, 2016) (Fig. 1.8 A). En América Central algunos autores asignan los restos de *Cuvieronius* a *C. tropicus* y otros a *C. hyodon*, no logrando un consenso (Lucas, 2008). Sin embargo, Prado *et al.* (2002; 2005), Alberdi *et al.* (2004) y Mothé y Avilla (2015) acuerdan que *C. tropicus* es una variación polimórfica y sinónimo de *Cuvieronius hyodon*. Por lo tanto, Lucas (2008; 2013) y Lucas *et al.* (2016), consideran el género *Cuvieronius* como monoespecífico, con *Cuvieronius hyodon* como única especie válida en toda América. En América del Sur, está presente desde Colombia al norte, Ecuador, Bolivia (Tarija) hasta el Norte de Argentina, Monte Verde en el Sur de Chile (Frassinetti y Alberdi, 2000; Prado *et al.*, 2005). Parodi (1962) afirma que sus restos debieron abarcar casi todo el norte de América del Sur. Los fósiles más antiguos encontrados en América del Sur, corresponden al Pleistoceno Inferior- Medio en Imbabura (norte de Ecuador).



Diagnosis del género: cráneo alargado y bajo (Frassinetti y Alberdi, 2000). Solo defensas superiores de sección subcircular, presenta torsión de forma helicoidal abierta y banda de esmalte que sigue la espiral, en sentido de las agujas del reloj en la defensa derecha y en sentido contrario en la defensa izquierda (Miller, 1990; Lucas, 2008; Lucas *et al.*, 2016). Con incisivos inferiores en ejemplares juveniles (Parodi, 1962; Mothé *et al.*, 2016). Presenta alvéolos divergentes (origen de las defensas) (Hoffstetter, 1950; Simpson & Paula - Couto, 1957; Parodi, 1962; Frassinetti *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2003; Corona *et al.*, 2006). Mandíbula abreviada, con sínfisis corta y en forma de pico (Parodi, 1962; Miller, 1990; Frassinetti *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2003; Corona *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2016). Molares con esmalte grueso en la zona pretrite y con dibujos en trébol cuando se desgastan (Miller, 1990; Lucas, 2008). Primeros y segundos molares trilofodontos, con tendencia hacia la tetralofodoncia en los segundos molares (Miller, 1990; Frassinetti *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2003). Terceros molares superiores con cuatro, hasta cinco lofos, y los inferiores hasta cuatro y medio lófidos (Miller, 1990). Con cíngulo mesial desarrollado (Miller, 1990).

- **Género *Haplomastodon* Hoffstetter, 1950:** creado como un subgénero y luego elevado a categoría de género (Parodi, 1962). Gonfoterio que tuvo su extensión geográfica hasta el norte de México (Graham, 2001). Probablemente compartió ambiente con *Mammut* y *Mammuthus* en el centro de México en el finipleistoceno (Graham, 2001). Alberdi y Prado (1995) y Alberdi *et al.* (2002), consideran que *Haplomastodon* es una



sinonimia de *Stegomastodon*. Cabe resaltar que Ferretti (2010), hace su propio arreglo de especies para América del Sur. Apoya como válido el género *Haplomastodon*, con la especie *Haplomastodon chimborazi*. Resalta que sus análisis cladísticos, demuestran que las muestras de *Stegomastodon platensis* de América del Sur, son muy distintas a las de América del Norte y que representarían a un taxón endémico, *Haplomastodon*. Habitó en el Pleistoceno tardío de América del Sur (Ferretti, 2010). Sus fósiles se encuentran en Ecuador, Brasil, Colombia, Venezuela y Perú (Simpson y Paula-Couto, 1957; Ferretti, 2010).

Diagnosis del género: Siguiendo a Ferretti (2010), gonfoterio brevirostro, se diferencia de otros gonfoterios de América del Sur por sus defensas cortas, gruesas y curvadas hacia arriba, en las que hay ausencia de esmalte. Los alvéolos de las defensas son ligeramente divergentes. Cráneo tipo elefantino, con hueso frontal y parietales hinchados que forman un amplio plano fronto-parietal. Borde anterior de la órbita ósea que se extiende hacia delante. Abertura nasal ancha y poco profunda, separada por una lámina ósea delgada de una fosa subnasal profunda. Presencia de foramen supraorbitario del maxilar. Porción alveolar de los premaxilares relativamente larga y robusta. Presencia de una fosa poco profunda para inserción muscular, en la base de la rama ascendente de la mandíbula. Posición del foramen mandibular en el lado medio de la rama ascendente marcadamente más alto que el plano oclusal. Arco dorsal del atlas muy grueso, con fuerte concavidad dorsal. Tubérculo ventral grande y robusto en el proceso transversal del atlas. No presenta defensas en la mandíbula. Dientes DP3/dp3 son trilofodontos y los P3/p3 P4/p4 ausentes. Los



terceros molares superiores (M3), son tretralofodontos. Los terceros molares inferiores (m3) con 4 a 5 lófidios. Los conos conúlidos ausentes o débilmente desarrollados.

- **Género *Notiomastodon* Cabrera, 1930:** género creado por Cabrera (1930).

El genotipo es *Notiomastodon ornatus*, del Pleistoceno temprano argentino. Este autor consideró formar un nuevo género, por la particularidad de sus fósiles y por no poder clasificarlo en ningún otro género conocido hasta ese momento. Osborn (1936) comentó que *Notiomastodon* es exclusivo de América del Sur. Cabrera (1930) argumentó que todos los demás mastodontes con banda de esmalte en las defensas, tienen sínfisis mandibular muy larga e incisivos inferiores, por lo tanto, *Notiomastodon* es único.

Parodi (1987), comenta que *Notiomastodon* fue creado por Cabrera (1930) sobre una rama mandibular izquierda, con dos molares y una defensa de un individuo semiadulto hallada en Monte Hermoso, provincia de Buenos Aires en Argentina. Además, incluyó otro material seleccionado en el Museo de Buenos Aires y en el Museo de La Plata, Argentina, correspondiente a *Cuvieronius*. Parodi (1962), menciona que *Notiomastodon* debe ser considerado como una sinonimia de *Stegomastodon*. El genotipo *Notiomastodon ornatus* de Buenos Aires y un colmillo del valle del río Tarija, descrito por Ameghino en 1888 como *Mastodon argentinus*, pero que correspondería a *Notiomastodon*, son los únicos ejemplares registrados hasta la actualidad.



Diagnosís del género: según Cabrera (1930), es un gonfoterio con sínfisis corta y sin incisivos en la mandíbula. Las defensas superiores encorvadas en todas las edades, y con una banda lateral de esmalte. Molares bunolofodontos y con los lofos/lófidos acompañados de cónulos accesorios, lo que por el desgaste produce una doble serie de tréboles.

- **Género *Stegomastodon* Pohlig, 1912:** conocido en América del Norte desde el Plioceno temprano hasta Pleistoceno temprano (Lucas *et al.*, 2011). Algunos de los yacimientos más antiguos se encuentran en Nuevo México, Estados Unidos (Morgan y Lucas, 2011). En América del Norte, han reconocido tres especies: *S. primitivus*, la que es considerada la más primitiva, del Plioceno temprano (Lucas *et al.*, 2011; Morgan y Lucas, 2011). Sus características son defensas superiores curvadas, M2/m2 trilofodontos, M3/m3 pentalofofos, y en algunos casos un sexto lofo/lófido poco desarrollado (Lambert y Shoshani, 1998; Lucas *et al.*, 2011). La especie *S. mirificus*, del Pleistoceno temprano (Lucas *et al.*, 2011; Morgan y Lucas, 2011). Se caracteriza por tener defensas superiores curvadas hacia arriba, sin banda de esmalte en ellas, M2/m2 trilofodonto, en algunos casos un cuarto lofo/lófidos, poco desarrollado (Lambert y Shoshani, 1998; Lucas *et al.*, 2011). Sus M3/m3 poseen seis lofos/lófidos, llegando a tener hasta siete y medio. Finalmente, la especie *S. aftoniae*, la cual es considerada la más derivada, del Pleistoceno temprano (Lucas *et al.*, 2011). Es un gonfoterio descrito mediante un M3 de siete lofos y un talón (Lambert y Shoshani, 1998). Se reconoce la convivencia de



Stegomastodon y *Mammuthus* en el yacimiento *Tortugas Mountain*, en Estados Unidos (Morgan y Lucas, 2011).

Es el género más evolucionado de los gonfoterios de América del Sur (Parodi, 1962). Hoffstetter (1950) menciona que los *Stegomastodon* más australes tienen molares menos complejos, en comparación a los de América del Norte. Los terceros molares (M3/m3), nunca tienen cinco lofos/lófidios, al contrario de los *Stegomastodon* del Norte. Cabrera (1930) asignó dos especies a este género *S. superbus* y *S. platensis* para América del Sur. Finalmente, en Alberdi y Prado (1995) y Prado *et al.* (2005) se sintetizó la clasificación de los gonfoterios de América del Sur. La nueva clasificación adscribió dos especies para el género; *S. platensis* y *S. waringi* (Fig. 1.8 B y C). Los fósiles de *S. platensis* han sido datados con edades que van del Pleistoceno Medio a tardío (Alberdi *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2005). Son típicos en la región pampeana de Argentina, y sobre todo frecuentes en Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, y en la provincia de Entre Ríos. También se encuentra en Uruguay, Paraguay, Monte Verde y Pilauco en el sur de Chile (Cabrera, 1930; Simpson y Paula-Couto, 1957; Prado *et al.*, 2002; 2005; Frassinetti y Alberdi, 2005; Recabarren, 2008; Recabarren *et al.*, 2014). En cuanto a *S. waringi*, sus fósiles se registran en Perú, Ecuador, en la península de Santa Elena, Taima – Taima en Venezuela, en Lagoa Santa en Minas Gerais y Bonito en Mato Grosso do Sul, Río Grande do Sul, en Brasil (Simpson y Paula-Couto, 1957; Alberdi *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2005). Es característico del Pleistoceno Medio y Superior (Alberdi *et al.*, 2002).



Diagnosis del género: se caracteriza por tener un cráneo corto y alto, con una talla corporal similar al de un elefante asiático actual. Sus defensas son largas y macizas, con una pequeña curvatura hacia arriba en algunos casos (Fig. 1.8). Las defensas no presentan esmalte en adultos, ni torsión. Los alvéolos que contienen las defensas, son cercanos a la línea media del cráneo (Prado *et al.*, 2005). Sus molares M2/m2 son trilofodontos y los M3/m3 son tretralofodontos o pentalofoodontos (Prado *et al.*, 2005). La morfología oclusal de los molares superior e inferior, se complica debido a la presencia o ausencia de cónulos y conúlidos centrales (Cabrera, 1930; Prado *et al.*, 2005).

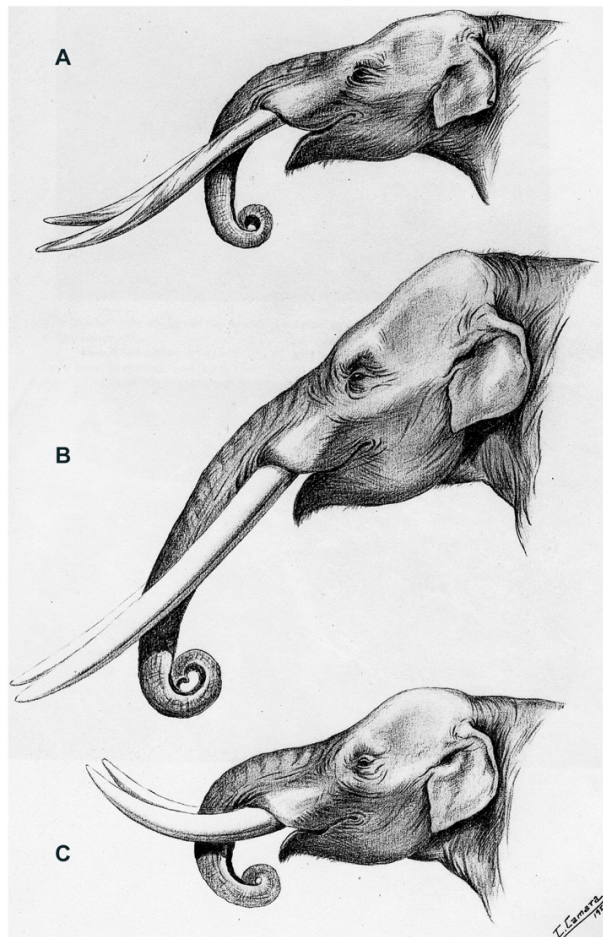


Figura 1.8- Dibujos de las cabezas de gonfoterios machos adultos de América del Sur. **A.** *Cuvieronius hyodon*, **B.** *Stegomastodon platensis* y **C.** *Stegomastodon waringi* (tomado de Simpson y Paula-Couto, 1957).



1.3- Problemática de los gonfoterios en América del Sur

Como en la mayoría de los grupos taxonómicos extintos, en este, los problemas de clasificación no han estado ajenos. Estas disparidades, se habrían producido por la creación de un alto e innecesario número de especies, al asignar valor diagnóstico a diferentes elementos anatómicos sin tener en cuenta si pertenecían a un mismo taxón (Prado *et al.*, 2005). Lo que dio origen a géneros y especies mal definidos. Estas dificultades radican desde los orígenes de los estudios de los gonfoterios sudamericanos, hasta la actualidad, provocando que no exista un consenso para la definición de algunos grupos (Cabrera, 1930; Parodi, 1962; Alberdi y Prado, 1995; Prado *et al.*, 2005; Mothé *et al.*, 2012). En la actualidad, se han hecho esfuerzos para ordenar toda la clasificación de la familia Gomphotheriidae en América del Sur (Alberdi y Prado, 1995; Frassinetti y Alberdi, 2000; 2005; Alberdi *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2003; 2005; Ferretti, 2008; Prado y Alberdi, 2008; Mothé *et al.*, 2012; 2013; 2017a; 2017b).

Para los fósiles de gonfoterio agrupados como *Stegomastodon platensis*, aún no existe un claro consenso en su clasificación, incluso su distribución ha sido fuertemente cuestionada (Alberdi *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2005; Mothé *et al.*, 2017a; 2017b).

Dentro de esta problemática y de las nuevas clasificaciones, tenemos que:

- **Validez cuestionable del género *Stegomastodon* en América del Sur:** Las diagnósis que separan a las dos especies; *S. platensis* y *S. waringi*, han sido puestas en duda (Mothé *et al.*, 2012; 2013). Esto debido a que las características que separan a los *Stegomastodon* de América del Sur, son mínimas y no deberían considerarse a nivel específico (Fig. 1.8 B y C)



(Mothé *et al.*, 2012). Incluso el género *Stegomastodon* ha sido cuestionado en América del Sur (Ferretti, 2010; Lucas y Alvarado, 2010; Mothé *et al.*, 2012; 2013). Una de las razones, es que no cuenta con un registro fosilífero en América Central y por lo tanto el género *Stegomastodon* nunca hizo ingreso durante el GABI (Lucas y Alvarado, 2010; Mothé *et al.*, 2017b) (Fig. 1.8 E). Aunque mucho antes Madden (1980) menciona que solo un género de proboscídeo migró hacia América del Sur (*Cuvieronius*) y los otros probablemente se originaron en el subcontinente. Además, desconoce la existencia del género *Stegomastodon* en América del Sur.

El género *Haplomastodon*, definido en base a su única especie *Haplomastodon chimborazi*, con cráneo alto con defensas curvadas y sin banda de esmalte, fue integrado al género *Stegomastodon* (Parodi, 1962; Prado *et al.*, 2005; Lucas y Alvarado, 2010). Sin embargo, hay autores que defienden la validez del género *Haplomastodon* y consideran que hay suficientes características que los diferencian de *Stegomastodon* (Ferretti, 2010; Lucas y Alvarado, 2010).

- **Género *Notiomastodon*:** en estudios recientes se ha cuestionado fuertemente el género *Stegomastodon*, en su lugar se incluye al género *Notiomastodon* Cabrera (1930) (Hoffstetter, 1950; 1952; Mothé *et al.*, 2012; 2013) (Fig. 1.8 F). En Mothé *et al.* (2012) se hace una síntesis del proceso. Ellos mencionan que el nombre *Notiomastodon* tiene prioridad por sobre *Haplomastodon* de Hoffstetter, 1950 y sobre *Mastodon platensis* (Ameghino, 1888). Abogan por el Principio de Prioridad del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, debido a que Ameghino (1888) no seleccionó



holotipo y que Cabrera (1930) basó su descripción en el mismo fósil, una defensa larga y recta (es considerado el holotipo, MLP 8-63 de San Nicolás de Los Arroyos, Argentina). *Notiomastodon* sería un género endémico de América del Sur y descrito por Cabrera (1930), con una sola especie *Notiomastodon ornatus*. Sus características principales serían una mandíbula con una sínfisis corta y sin defensas en ella. Las defensas superiores se curvan hacia arriba y presentan una banda de esmalte lateral. Sus molares son bunodontos, con los lofos/lófidios acompañados de cónulos accesorios, los cuales al desgastarse producen una doble serie de figuras en forma de trébol. La especie *Notiomastodon platensis* es sugerida por Madden (1980) y Ferretti (2008) y es ratificada por Lucas y Alvarado, (2010) y Mothé *et al.* (2013). Esta nueva especie englobaría todas las características atribuibles al género *Stegomastodon* presente en América del Sur. Además, agregaría la presencia de esmalte en las defensas en los individuos en estado adulto, lo que antes no se tomaba como atributo para los *Stegomastodon* (Mothé *et al.*, 2012; 2013). Así mismo, Mothé *et al.* (2017b) destacan que los análisis filogenéticos muestran que *Notiomastodon platensis* no tiene relación con los *Stegomastodon* de América del Norte. También ellos mencionan que las distribuciones temporales y distribuciones geográficas discontinuas, de los fósiles de *Stegomastodon* y *Notiomastodon* entre América del Norte y Sur, son contundentes para afirmar que los únicos proboscídeos en América del Sur son *Cuvieronius hyodon* y *Notiomastodon platensis* (Fig. 1.8 B, D, G y A, C y F).

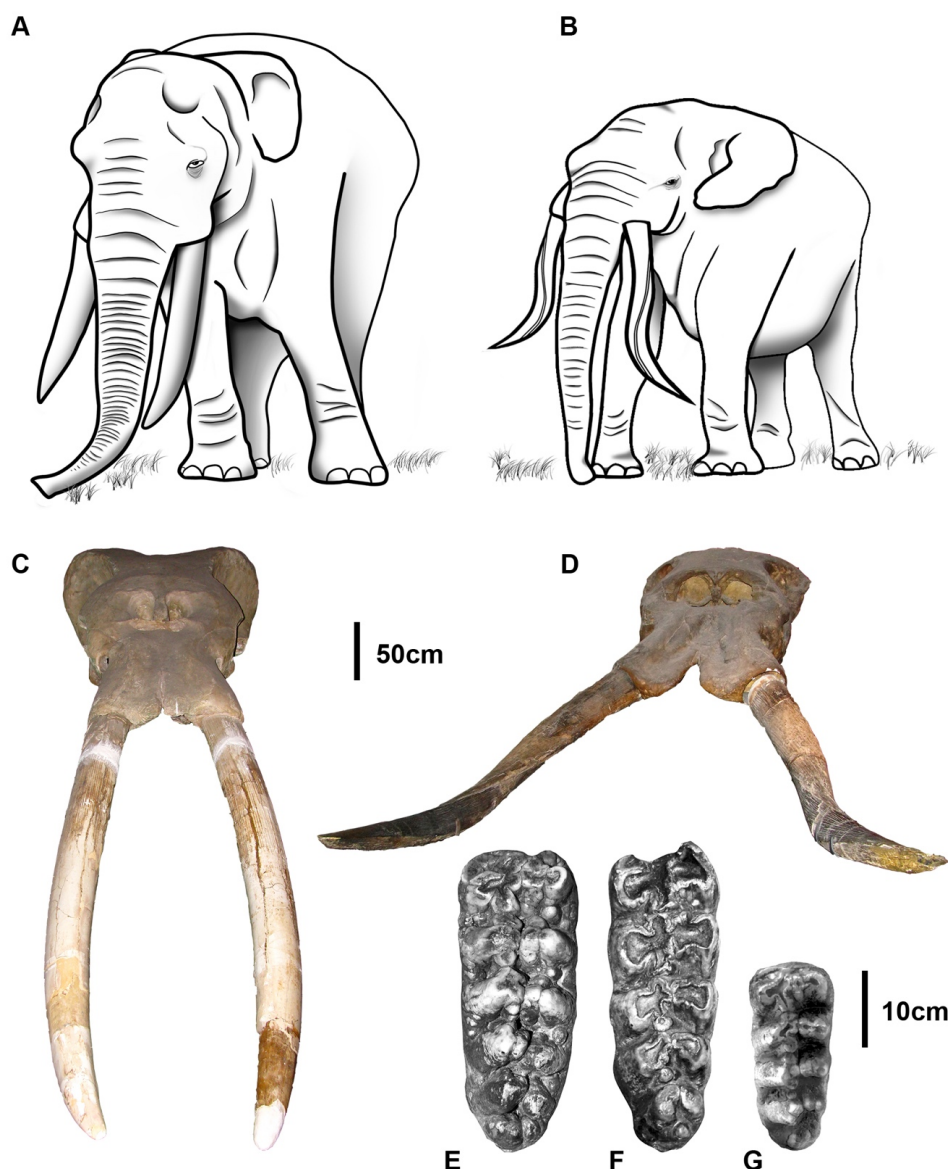


Figura 1.8- Gonfoterios de América del Sur: **A.** representación y **C.** cráneo (Museo de la Plata, Argentina) con defensas de *Notiomastodon platensis* (= *Stegomastodon platensis*). **B.** representación y **D.** cráneo (Museo de Buenos Aires, Argentina) con defensas de *Cuvieronius hyodon*. Terceros molares inferiores izquierdos (m3) de gonfoterio: **E.** *Stegomastodon* (AMNH DVP 25000), de American Museum of Natural History, USA. Tomado de Mothé *et al.* (2017b). **F.** *Stegomastodon* (= *Notiomastodon*) (DGM-M 133), de Museu de Ciências da Terra do Departamento Nacional de Produção Mineral, Brasil. Tomado de Mothé *et al.* (2017b). **G.** *Cuvieronius hyodon* de Chahal, Guatemala. Tomado de Lucas *et al.* (2016).



- **Paradigma de los registros geográficos en América del Sur:** Alberdi *et al.* (2002) y Prado *et al.* (2005), entre otros, establecieron como modelo de distribución de los gonfoterios, el margen oeste para *Cuvieronius hyodon* y el margen este para *Stegomastodon platensis* (Fig. 1.9 A). El modelo mantenía la categoría de gonfoterios de “tierras bajas” a *Stegomastodon* y sus fósiles afines, y de gonfoterios de latitudes altas a *Cuvieronius hyodon*. Recientemente Mothé y Avilla (2015), en una revisión de los yacimientos con fósiles de gonfoterio en América del Sur, desestimó este paradigma y modificó completamente el mapa de la distribución de los gonfoterios (Fig. 1.9 B). Estos autores manifiestan que la distribución geográfica de *C. hyodon* y *N. platensis* (= *S. platensis*), no tiene exclusividad por altura. Ambos taxones se han registrado entre los 80 hasta los 3.800 m s. n. m., pero sí reconocen una barrera biogeográfica, constituida por la humedad ambiental y que fue una limitante en los Andes Tropicales para la distribución de *C. hyodon*.
- **El gonfoterio más antiguo de América del Sur:** la edad más antigua de los gonfoterios sudamericanos también ha sido debatida. La especie *Amahuacatherium peruvium* fue presentada como el gonfoterio más antiguo de América del Sur (Campbell *et al.*, 2000). Los fósiles de esta especie se relacionaron con sedimentos que tienen una edad Mioceno tardío, alrededor de 9.5 Ma, en el Amazonas de Perú (Campbell *et al.*, 2000; 2009). Su descripción lo identifica como un gonfoterio tetrabelodon (cuatro defensas), que mantuvo sus defensas en la mandíbula brevírostra. Sus molares presentan, en una vista oclusal, un patrón complejo (Campbell *et*



al., 2000; 2009). Sin embargo, su validez taxonómica y edad fueron fuertemente cuestionados (Lucas, 2013). Algunos incluso lo relacionan al género *Stegomastodon*, aunque esto también debe revisarse (Prado *et al.*, 2005). Una de las razones referidas para no aceptar la edad propuesta por Campbell *et al.* (2000; 2009), es que hasta ahora no hay registro de proboscídeos más antiguos al Pleistoceno Medio en América del Sur (Prado *et al.*, 2005).

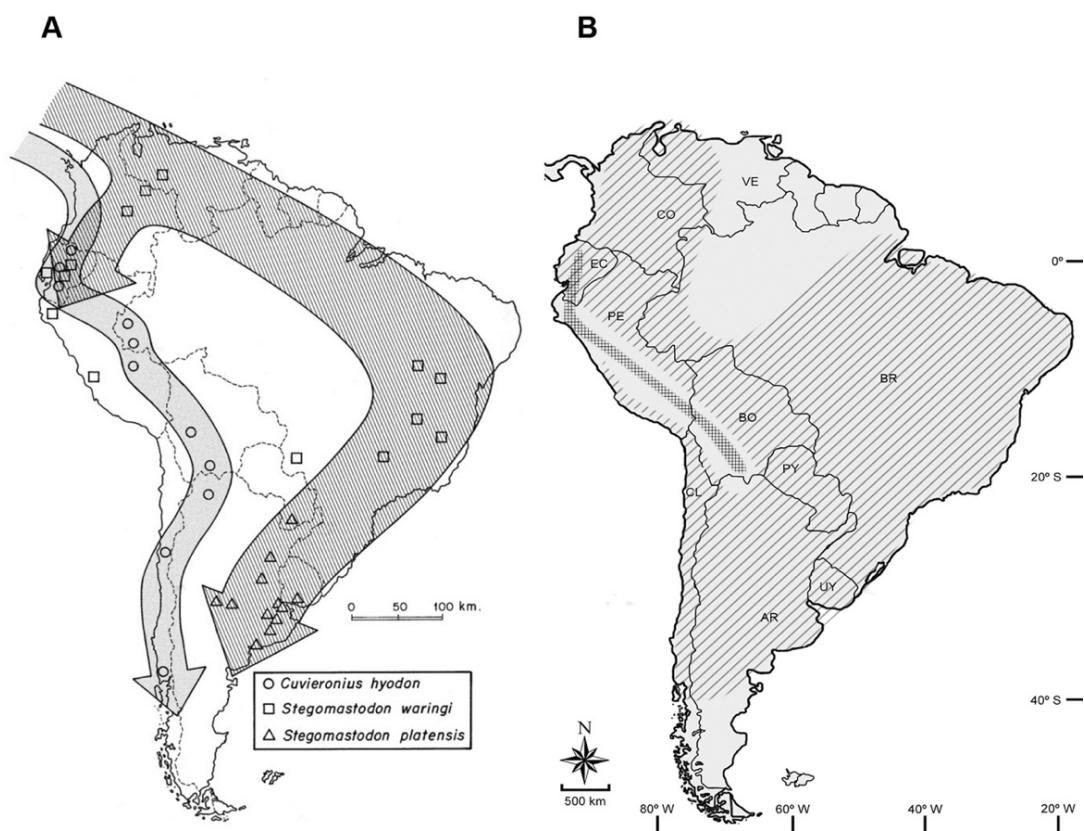


Figura 1.9- Mapas con la distribución de los registros de gonfoterios en América del Sur. **A.** mapa tomado de Prado *et al.* (2005) y **B.** mapa tomado de Mothé *et al.*, (2017), las líneas cruzadas representan a *Cuvieronius hyodon* y las líneas en paralelo representan la distribución de *Notiomastodon platensis*.



2- OBJETIVO DE LA TESIS



2.1- Objetivo general

El objetivo general de esta tesis es establecer nuevos caracteres para la diagnosis de los gonfoterios de América, mediante el colágeno (I), la histomorfometría y sus atributos morfogeométricos. Contribuyendo a la diferenciación y mejoramiento de las clasificaciones taxonómicas de la familia Gomphotheriidae en América.

3- ANTECEDENTES



3.1- Introducción

La Paleontología es la ciencia que se ocupa del descubrimiento y estudio del registro fósil, para así reconstruir la historia de la vida, y se basa en la Paleobiología y la Tafonomía, así como la Biología se basa en la Neontología y la Paleobiología (Simpson, 1985; Fernández-López, 2000; Benton y Harper, 2009). Los fósiles, son entendidos como restos y/o señales observables (directa o indirectamente) que fueron producidas por entidades biológicas del pasado o por entidades previamente conservadas (Fernández-López, 2001; Benton y Harper, 2009; Forasiepi *et al.*, 2012). Los paleontólogos asumimos la tarea de investigación y descubrimiento de los fósiles, los excavamos y es en la excavación donde hay mucha información que necesitamos rescatar para su estudio, como si fuera una escena del crimen (Benton y Harper, 2009). Como el campo de la Paleontología es tan diverso, hay muchos tipos de datos que podemos usar para resolver un problema, estos pueden ser: ecológicos, morfológicos, histológicos, moleculares, etc., así como métodos para su análisis (Hammer y Harper, 2006).

En el presente capítulo, se abordará y comentará el tipo de datos que se obtuvieron y de las técnicas analíticas que se ocuparon en las muestras para resolver el objetivo general de esta tesis.

3. 2- Paleontología molecular

Moreno (2005), menciona que durante mucho tiempo se consideró a la Taxonomía y a la Sistemática como sinónimos de la clasificación de los organismos. Sin embargo, la Sistemática tiene como principal tarea almacenar la información clasificada y permitir su fácil recuperación. Para esto se requieren:



colecciones, conservación, descripción, designación inequívoca (nomenclatura), catalogación, identificación, establecimiento de la historia evolutiva (filogenia), orden (Taxonomía), divulgación, estudio de la evolución etc. Por otra parte, ocurre algo similar con la biología molecular. Ya que en ella se describen moléculas, familias de moléculas, se identifican y se hacen filogenias de los genes y proteínas. Además, se incorporan las características de las moléculas (marcadores, secuencias), lo que proporciona muchos datos para ser aplicados al método comparativo.

Para la biología molecular son importantes los biopolímeros, como los ácidos nucleicos, las proteínas o los carbohidratos, ya que todos los organismos los poseen. Tienen una amplia variedad de compuestos orgánicos relacionados con los elementos como el carbono, hidrogeno, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo entre otros (Eglinton y Logan, 1991; Waggoner, 2001). Entre todos estos biopolímeros los ácidos nucleicos tienen el potencial más bajo de conservación (Waggoner, 2001). Sin embargo, los análisis de ADN y de las proteínas han experimentado un enorme progreso en los últimos años, sobre todo para revelar los procesos biológicos a lo largo del Cuaternario. Los científicos que estudian este Período, tienen un enorme potencial mediante el uso de las biomoléculas (Yang, 1997; Hofreiter *et al.*, 2012).

La filogenia molecular utiliza todas estas herramientas (ADN, secuencias de proteínas y otros marcadores moleculares). A través de ellas, se pueden reconstruir los lazos genealógicos entre entidades biológicas y determinar el tiempo de divergencia entre organismos. De esta manera, se puede observar la secuencia de eventos a lo largo de la evolución de los linajes (Graur y Li, 2000).

Las características de las macromoléculas como el ADN y las proteínas (*e. g.*, colágeno), que se aplican en la filogenia molecular, son:



3.2.1- Los ácidos nucleicos

De acuerdo a Müller-Esterl (2008), las instrucciones para la construcción de la vida están escritas en forma de ácidos nucleicos. En ellos se deposita todo el plan de desarrollo de un organismo, así como las instrucciones para la actividad celular. Toda esta información hereditaria, que posee un organismo, se llama genoma y esta perfectamente organizada. El desarrollo de los organismos está programado por estas moléculas (Mathews *et al.*, 2002). Los ácidos nucleicos se dividen en dos clases: ácido desoxirribonucleico (ADN), el que tiene funciones exclusivamente de almacenamiento de información y el ácido ribonucleico (ARN), implicado en la mayoría de los pasos de la expresión génica y la biosíntesis proteica. Todos los ácidos nucleicos están formados por nucleótidos, los cuales poseen una base nitrogenada, un azúcar y un residuo de fosfato. El ADN y el ARN difieren en una de las bases nitrogenada y en el tipo de azúcar (Koolman y Roehm, 2005).

En los comienzos, el proceso de clonación de una molécula de ADN hacía difícil estudiarla en el material fósil. Los grandes avances técnicos posteriores, que incluyeron el desarrollo y la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cambiaron radicalmente la situación. Esto hizo que la recuperación del ADN endógeno, a partir de muestras antiguas, sea relativamente sencillo (Austin *et al.*, 1997; Yang, 1997).

En la Arqueología, los fósiles de huesos y dientes han sido ampliamente usados, debido a que son reservorios duraderos del ADN antiguo (ADNa) (Gilbert *et al.*, 2006; Adler *et al.*, 2011). Este ADNa se conserva en pequeñas cantidades y en diferentes estados de degradación. Para los investigadores es crucial que el ADNa esté disponible, para la posterior manipulación enzimática (Rohland y Hofreiter, 2007). Sin embargo, el gran problema en la manipulación



del ADN es la contaminación por medio del ADN extraño, lo que hace difícil la obtención de ADN puro (Brown y Brown, 1992).

3.2.2- Las proteínas

Son las más abundantes macromoléculas biológicas, se producen en todas las células y están presentes en todas las estructuras de la anatomía celular. Las proteínas son el instrumento molecular, a través de las cuales se expresa la información genética. Sus subunidades monoméricas, proporcionan la clave para las estructuras de miles de proteínas diferentes. Desde los orígenes, todos los organismos extintos y actuales incluyendo a las bacterias más antiguas, tienen proteínas. Sus constituyentes son 20 aminoácidos (AA) enlazados covalentemente en secuencias lineales características (Ambler y Daniel, 1991). Con estos bloques de construcción, los organismos pueden fabricar productos como las enzimas, hormonas, anticuerpos, fibras musculares, plumas, telas de araña, cuernos de rinocerontes, proteínas de leche, antibióticos, venenos, así como muchas otras sustancias que cumplen múltiples funciones biológicas (Lehninger, 2009; Brown y Brown, 2013).

Para determinar la secuencia de AA en los péptidos, los cuales son moléculas pequeñas unidas a dos o más AA mediante enlaces peptídicos (unión covalente entre el grupo α -carboxilo y el grupo α -amino de los AA), Edman (1950) desarrolló una técnica conocida como Degradación de Edman. Este método se basa en la identificación de los AA que han sido divididos químicamente de forma gradual, desde el extremo amino terminal de la proteína (Steen y Mann, 2004).



Los métodos para la secuenciación de los AA fueron desarrollados en 1959, pero los procedimientos eran lentos y requerían muestras puras de proteínas (Steen y Mann, 2004). Durante los años noventa la espectrometría de masas (MS), técnica en la que las biomoléculas se ionizan y su masa se cuantifica siguiendo su trayectoria específica en un sistema de vacío, se generalizó. Esta nueva técnica desplazó la Degradación de Edman, ya que era mucho más sensible y podía fragmentar los péptidos en cuestión de segundos, en lugar de horas o días (Steen y Mann, 2004).

3.2.3- Las proteínas fósiles

El aumento del interés por esta área de investigación se debe a que, en la actualidad, se sabe que las proteínas contienen y son un importante cúmulo de información biológica (Ostrom *et al.*, 2000) (Fig. 3.1).

Eglinton y Logan (1991), mencionan que la integridad molecular de las proteínas se puede perder durante los procesos de fosilización. Esto es producto de la hidrólisis del enlace peptídico, lo que da lugar a cadenas progresivamente más cortas de unidades de ácidos α -amino. Sin embargo, estas unidades cortas pueden contener información suficiente para el reconocimiento de proteínas mediante técnicas inmunológicas. Otros procesos de degradación que pueden afectar a las proteínas antiguas, son los procesos de degradación que incluyen ataques a las cadenas laterales de los aminoácidos, tales como al grupo amino, carboxilo e hidroxilo, entre otras agrupaciones. Todos estos procesos podrían ocasionar la pérdida total o parcial de identidad de la molécula de proteína.



Aunque en la degradación selectiva (*e. g.*, en los grupos amino), aún se podría reconocer la proteína por medio de procedimientos analíticos apropiados.

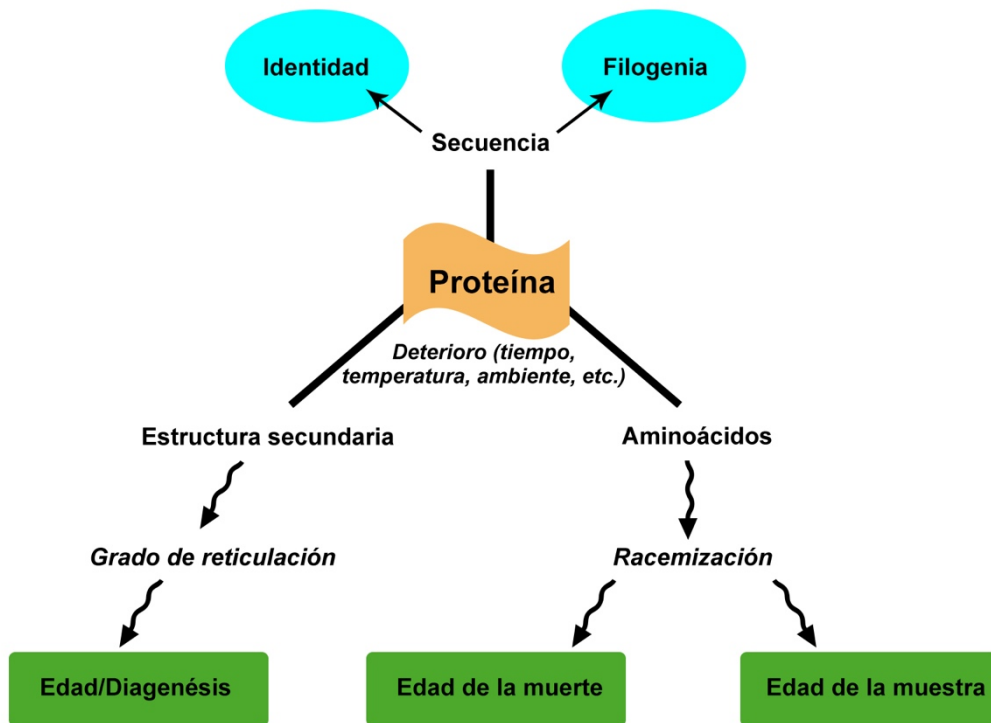


Figura 3.1- Esquema de la importancia de las proteínas y el análisis en los fósiles (modificado de Collins *et al.*, 2005).

3.2.4- El colágeno

El colágeno constituye una familia de proteínas, presentes en la matriz extracelular de los tejidos conectivos de todos los animales. Es la proteína más abundante en el reino animal (Shoulders y Raines, 2009).

Son proteínas responsables de mantener la integridad estructural en los vertebrados y de muchos otros organismos multicelulares. Este colágeno está formado por tres cadenas de polipéptidos (péptido con más de diez AA), de α -cadenas, formando una estructura de triple hélice. El colágeno tiene más de 28



formas, presente en los tejidos animales. Algunas de estas formas (tipo I, II, III, V y XI) están dispuestas en fibrillas y se encuentran en los tejidos que resisten tracción, o fuerzas de compresión como en los tendones, hueso, cartílago y piel (Viguet-Carrin *et al.*, 2006; Buckley, 2016). El colágeno es la proteína más abundante y, por lo tanto, su uso es común en los estudios de vertebrados cuaternarios. Fundamentalmente se usa el colágeno presente en los huesos, dentina, astas y marfil (Hofreiter *et al.*, 2012). El colágeno de la piel y otras proteínas de la matriz extracelular como: la queratina del pelo, de las astas, pezuñas, uñas, garras, plumas, barbas (en ballenas misticetos) y de los caparazones de reptiles, se encuentran con menor frecuencia. Estando restringidos en ambientes de depositación en el que la descomposición microbiana es menos efectiva (Jones *et al.*, 2001; Hofreiter *et al.*, 2012). Es importante destacar que el colágeno se ha logrado rescatar de yacimientos arqueológicos, donde el material óseo ha sido fuertemente atacado térmicamente (Ottoni *et al.*, 2009).

3.2.5- El colágeno del hueso, el colágeno (I)

La mayor proporción de la masa corporal que ocupa el tejido conectivo, la conforma el hueso (Jiang *et al.*, 2007). El hueso calcificado contiene el 25% de la matriz orgánica, esto incluye las células (entre 2 a 5%), 5% de agua y el 70% restante lo constituyen minerales inorgánicos como el hidroxipatito (Sommerfeldt y Rubin, 2001).

La molécula de colágeno (I) está compuesta por dos heterotrímeros; dos $\alpha 1$ (I) y una $\alpha 2$ (I) cadenas, y contiene una ininterrumpida triple hélice (~1000



residuos de cadena), aproximadamente 300 nm de largo y de 1,5 nm de diámetro, flanqueado por cortas cadenas de telopéptidos no helicoidales (Collins, 1995; Buckley *et al.*, 2008a; 2010; Shoulders y Raines, 2009). Esta proteína es la más abundante en los mamíferos (Buckley *et al.*, 2010). Con una secuencia que se repite Glicina-X-Y y el AA prolina (Pro) ocupa la posición X y otras Y, pero es menos común (Collins, 1995) (Fig. 3.2). Este colágeno es predominante en la matriz de los huesos frescos, y tiene una composición de AA muy característico, rica en glicina y prolina y también contiene dos AA inusuales como hidroxiprolina e hidroxilisina, formados por modificaciones de dos AA esenciales (Ambler y Daniel, 1991). El colágeno (I) es conocido por su extraordinaria longevidad (aproximadamente 3,5 Ma) y es particularmente resistente a la descomposición (Buckley y Collins, 2011; Buckley y Kansa, 2011; Rybczynski *et al.*, 2013; Buckley *et al.*, 2014; Buckley, 2015). Se cree que la supervivencia del colágeno aumenta debido al confinamiento de la estructura de triple hélice, dentro del mineral de bioapatita y por su propia naturaleza de proteína altamente insoluble (Covington *et al.*, 2008; Buckley y Collins, 2011). Comparado con la amplificación del ADN, la posibilidad de contaminación del colágeno es mucho menos probable (Buckley *et al.*, 2008b). También es posible tomar una muestra directamente del fósil, evitando el riesgo de contaminación durante el proceso de amplificación, proceso usado generalmente en el análisis de ADN (Buckley *et al.*, 2014). El enterramiento por un largo periodo de tiempo, aumenta la posibilidad de obtención de la huella del colágeno, debido a que con el tiempo otras proteínas como la hemoglobina y la osteocalcina, desaparecen. Lo cual, provoca el enriquecimiento selectivo de colágeno (I) en los fósiles (Collins *et al.*, 2010).

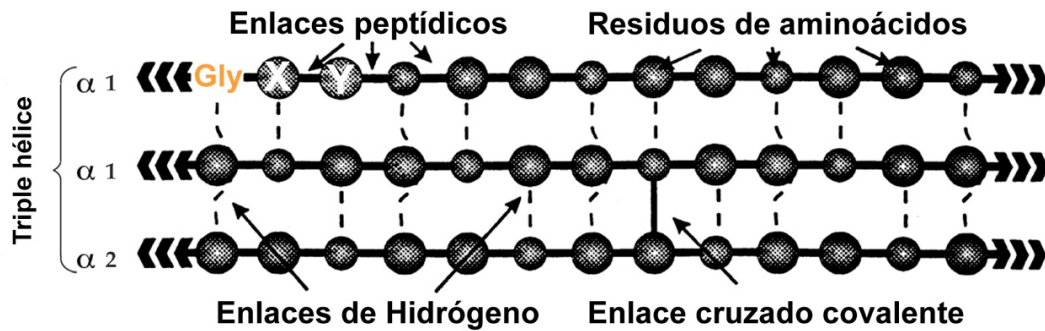


Figura 3.2- Esquema del colágeno (I), con su triple hélice (modificado de Collins, 1995).

Buckley *et al.* (2009) indican que una de las tres cadenas de polipéptidos, que componen la triple hélice de colágeno (I) (cadena Col1A2), presenta una mayor variabilidad en la secuencia de AA. Esto hace posible la discriminación de géneros estrechamente relacionados y hace que los péptidos de colágeno sean útiles en Paleontología y Arqueología (Buckley *et al.*, 2010).

La ventaja de usar el colágeno por sobre otros métodos moleculares de identificación, es el potencial que tiene en la mayoría de los conjuntos faunísticos del Cuaternario de ser aplicado en fragmentos inidentificables, permitiendo la identificación a nivel de género e incluso a nivel de especie (Rybczynski *et al.*, 2013; Buckley y Collins, 2011; Buckley *et al.*, 2014; van der Sluis *et al.*, 2014).

3.2.6- Técnica de obtención de la huella del colágeno (I)

La espectrometría de masas proteómicas se aplicó por primera vez a las proteínas fósiles por Ostrom *et al.* (2000). La técnica utiliza pequeñas muestras, de 1-50 mg y produce resultados rápidos en 24 o 48 horas (Buckley *et al.*, 2016;



Harvey *et al.*, 2016). El colágeno extraído y analizado a través de la espectrometría de masas de ionización blanda, se basa en una digestión trípica para generar una huella identificable de masa peptídica. Los contaminantes exógenos que pueden sesgar una datación por medio del colágeno, no afectan en los análisis de obtención de la huella del colágeno (Hervey *et al.*, 2016). Si el PCR fue un gran avance en el estudio del ADN antiguo, entonces los avances en la espectrometría de masas de ionización blanda son igual de revolucionarias para el estudio de las proteínas antiguas (Jones, 2001). Con estos avances se pueden realizar el análisis de proteínas y péptidos con un alto rendimiento, lo que incluye el análisis de secuencias de reconocimiento y la detección de modificaciones postraduccionales (Collins *et al.*, 2005). Estas tecnologías son muy útiles para usar los pequeños fragmentos que se pueden analizar con esta técnica (Collins *et al.*, 2005). Asara *et al.* (2007), comentan que en un futuro se podrían obtener secuencias de proteínas de organismos raros o en peligro de extinción.

Para estos análisis, los espectrómetros de masa cumplen un papel fundamental. Estas máquinas constan de tres partes principales; la primera es una fuente de ionización, que produce iones a partir de la muestra. La segunda, es el analizador de masa, que identifica los iones en función de su masa/carga (m/z), y la tercera parte es el detector de iones (Liebler, 2002) (Fig. 3.3). En resumen, el espectrómetro de masas convierte los componentes de una mezcla en iones y luego los analiza en base a su m/z . Los datos son registrados automáticamente por el sistema de datos y pueden ser recuperados por medio de interpretación manual o asistida por ordenador (Liebler, 2002).

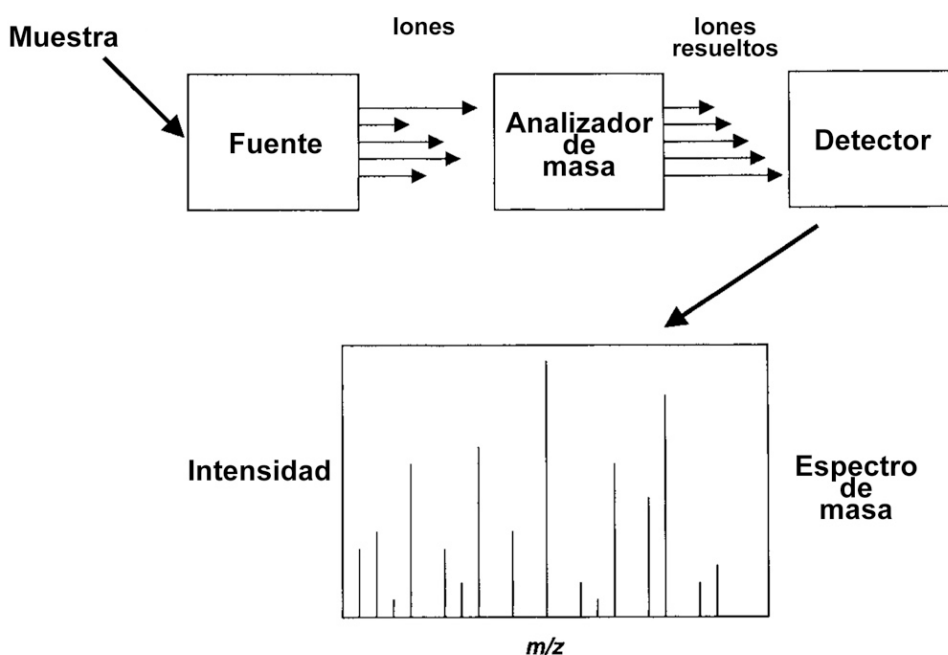


Figura 3.3. Figura esquemática del funcionamiento de un espectrómetro de masas (tomado de Liebler, 2002).

3.2.7- El espectrómetro de masa MALDI-TOF

La espectrometría de masas (EM) de *time-of-flight* (TOF) (Fig. 3.4 B), con desorción/ionización asistida por láser (MALDI) (Fig. 3.4 A), produce iones protonados en fase gaseosa, por medio de la excitación de las moléculas de la muestra, a partir de la energía del láser, transferida por medio de una matriz de absorción de luz ultravioleta (UV) (Aitken, 2005). La matriz es un compuesto orgánico conjugado, normalmente un ácido orgánico débil (Aitken, 2005). Diferentes compuestos de la matriz de MALDI son óptimos para biomoléculas particulares, y absorben el máximo la luz a la longitud de onda del láser, es típicamente un láser de nitrógeno de 337 nm (Aitken, 2005).

El término "MALDI" describe un método de ionización, pero en la literatura proteómica se utiliza frecuentemente como abreviatura de MALDI-



TOF (Fig. 3.4). Sin embargo, tanto las fuentes MALDI como los analizadores TOF pueden utilizarse en otras configuraciones. La ventaja particular de MALDI es la capacidad de producir iones de gran masa con alta sensibilidad, ya que es un método de ionización muy "suave" (Aitken, 2005). También es una técnica valiosa para examinar mezclas, ya que los espectros están compuestos principalmente de iones de proteínas y péptidos intactos cargados individualmente. Otras ventajas del MALDI-TOF es su uso en aplicaciones de alto rendimiento y su tolerancia relativa a los contaminantes de los tampones y las sales en la muestra, en comparación con el *electrospray* EM (Aitken, 2005). La muestra a analizar se mezcla con una matriz química, la cual contiene típicamente una pequeña molécula orgánica con un cromóforo deseable que absorbe la luz a una longitud de onda específica. Los compuestos típicos de la matriz incluyen el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, el ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico) y el ácido α -cyano-4-hidroxicinámico (Liebler, 2002). La mezcla de la muestra y la matriz se deposita en una pequeña placa o portaobjetos y se deja evaporar en el aire (Liebler, 2002). La evaporación del agua residual u otro disolvente de la muestra permite la formación de una red cristalina en la que se integra la muestra peptídica (Liebler, 2002). El objetivo se coloca en la fuente, la cual está equipada con un láser que dispara un rayo de luz al objetivo. Las sustancias químicas de la matriz absorben los fotones del haz y se excitan electrónicamente. Este exceso de energía se transfiere a los péptidos o proteínas de la muestra, que son expulsados de la superficie a la fase gaseosa (Liebler, 2002) (Fig. 3.4).

Este proceso de ionización produce iones positivos y negativos, dependiendo de la naturaleza de la muestra. Para péptidos y proteínas, los iones positivos son casi siempre las especies de interés (Fig. 3.4 A). Los iones positivos se forman al aceptar un protón a medida que se expulsan de la matriz y cada



molécula peptídica tiende a recoger un solo protón. Por lo tanto, la mayoría de los iones péptidos resultantes están cargados individualmente. Por ejemplo, para un péptido de masa 1032, la adición de un protón y su carga positiva hace que el valor m/z sea 1033 para el $[M+H]^+$ ion. Los iones formados en la fuente de MALDI se extraen y se dirigen al analizador de masas TOF (Liebler, 2002). El analizador de masa TOF (*time of flight*) funciona tal y como suena su nombre. Este analizador mide el tiempo que tardan los iones en volar de un extremo al otro y golpear el detector (Fig. 3.4 B). La velocidad con la que los iones bajan por el tubo del analizador es proporcional a sus valores m/z , así cuando es mayor el m/z , más rápido vuelan (Liebler, 2002).

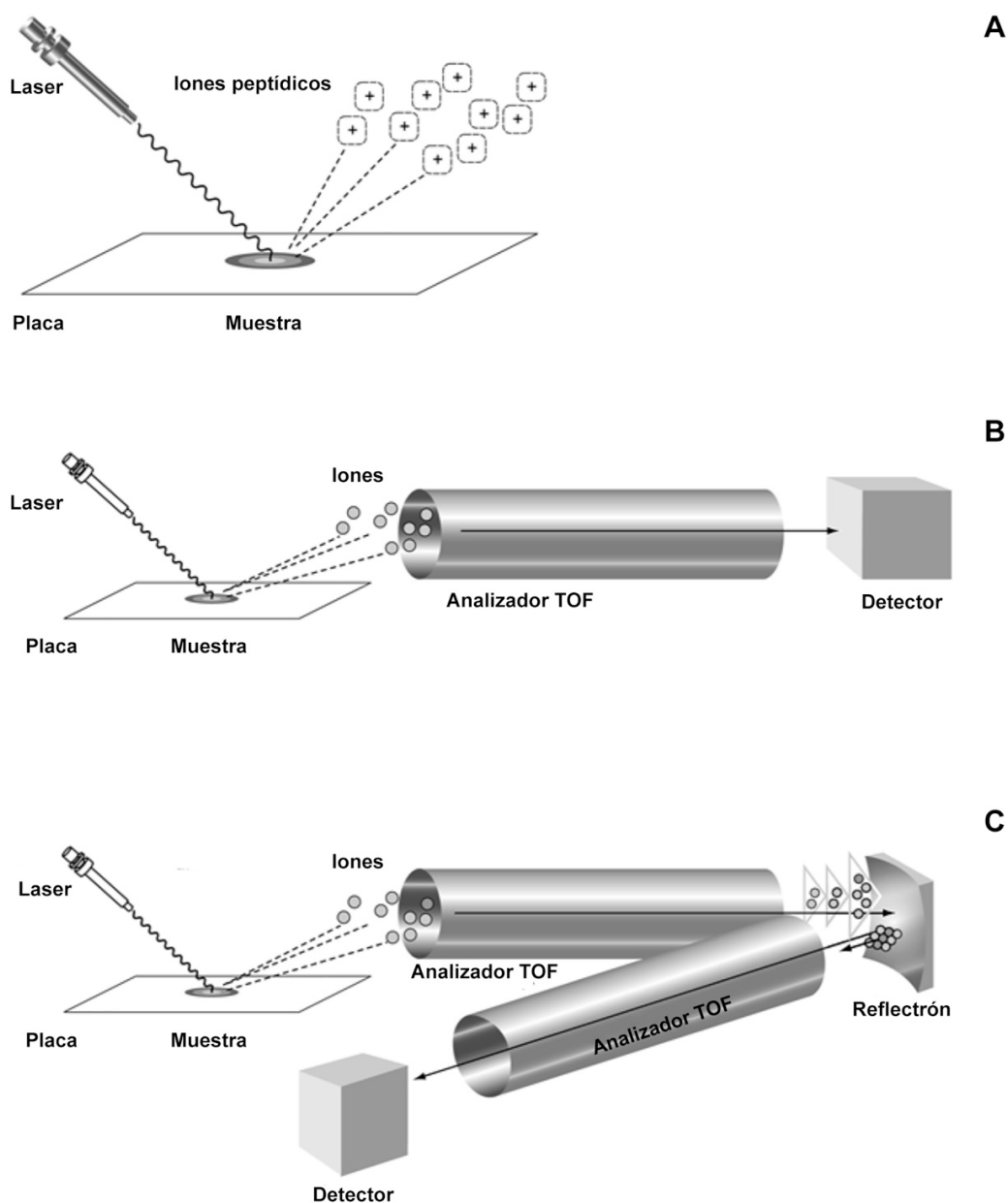


Figura 3.4- Representación esquemática de un espectrómetro de masas MALDI-TOF. (A) El proceso de ionización MALDI. (B) Un instrumento MALDI-TOF que funciona en modo lineal. (C) Un instrumento MALDI-TOF equipado con un reflectrón para mejorar el poder de resolución de los iones (modificado de Liebler, 2002).



Aitken (2005) resume el proceso:

- I. Se dirige un láser ultravioleta a la muestra (con un diámetro de haz de unos pocos micrones) para desorción. La radiación láser, de unos pocos ns de duración, es absorbida por las moléculas de la matriz, causando un rápido calentamiento de la región alrededor del área de impacto del láser y excitación electrónica de la matriz. La matriz sirve como medio de absorción de la luz ultravioleta, convirtiendo la energía láser incidente en energía electrónica molecular, tanto para desorción como para ionización, y como fuente de iones H^+ para transferir a la molécula del analito e ionizarla.
- II. TOF está acoplado a MALDI ya que esta técnica tiene un rango de masas virtualmente ilimitado. Los iones entran en el tubo de vuelo, donde son acelerados con el mismo potencial en un punto fijo y a un tiempo inicial fijo. Puesto que la energía cinética depende puramente de la masa y la velocidad, y la energía cinética de todos los iones es nominalmente la misma, los iones se separarán de acuerdo con su relación masa/carga (m/z), y los iones más ligeros viajarán más rápido que los iones más pesados hacia el detector. Finalmente, este tiempo de vuelo se convierte en masa.
- III. La exactitud de la masa es el m/z de un pico en un espectro, dividido por el ancho de ese pico a media altura, expresado en partes por millón. El



límite de detección se encuentra actualmente entre los femtomoles (10^{-15} moles) y los picomoles (10^{-12} moles), pero se puede lograr la detección del attomol (10^{-18} moles). Si se aplica una muestra de 0,5 μL al objetivo de MALDI, el rango de concentración está entre micromolar y picomolar.

- IV. Los tipos de placas de muestra para MALDI incluyen placas planas de acero inoxidable con muchos espacios, que se utilizan para el análisis de múltiples muestras, con una calibración externa minuciosa que emplee uno o más compuestos de peso molecular conocido.

3.3- Histomorfometría ósea

La histomorfometría o histología cuantitativa, consiste en el recuento o medición de los componentes tisulares: las células o los testigos extracelulares o ambos (Boivin y Meunier, 1993). La histomorfometría es una metodología para analizar cuantitativamente: el perímetro (como el perímetro de las osteonas), la distancia entre puntos, distancia entre las líneas centrales de dos trabéculas, el área, como el área ósea trabecular, y el número de componentes de interés, como el número trabecular, el número de vasos o el número de células, etc. (Recker, 1983; Parfitt, 1987). Estos parámetros son las mediciones que se pueden realizar a partir de imágenes bidimensionales (2D) (Torben y Hauge, 2003).

Es posible utilizar diferentes métodos para las mediciones histológicas realizadas en secciones de muestras óseas (Delesse 1847). El primer método, consiste en proyectar rejillas sobre la sección de la muestra ósea (Schenk *et al.*,



1969; Meunier, 1983). El porcentaje de impactos sobre una estructura o el número de intersecciones entre la rejilla y los perímetros óseos son estimaciones precisas de la densidad volumétrica o superficial del componente analizado (Schenk *et al.*, 1969; Meunier, 1983). Este sistema manual de recuento por puntos, sigue siendo el más utilizado, aunque requiere el análisis de un gran número de campos y de mucho tiempo de análisis (Schenk *et al.*, 1969; Meunier, 1983). El segundo método, utiliza un ordenador de análisis de imágenes, que reduce considerablemente los tiempos (Meunier 1973). Estos dispositivos totalmente automatizados son muy adecuados para la medición del volumen o densidad ósea, pero no para la evaluación de las superficies de remodelación o de los parámetros dinámicos que deben ser identificados cualitativamente antes de su cuantificación (Boivin y Meunier, 1993). Además, a pesar de los recientes avances en las técnicas de imagen, los ordenadores, todavía, no son capaces de identificar células o artefactos de tinción y seccionamiento (Boivin y Meunier, 1993).

3.3.1- La estructura ósea

Fundamentalmente, el hueso está formado por células y una matriz extracelular predominante colágena (colágeno del tipo I), denominada osteoide, el que se mineraliza por el depósito de hidroxapatita cálcica (Young y Heath, 2001). Al igual que otros tejidos conectivos, el hueso está formado por células y fibras, pero a diferencia de los demás, sus componentes extracelulares están calcificados, lo que lo convierte en una sustancia dura y firme que resulta ideal para su función de apoyo y protección (Bloom y Fawcett, 1994). El hueso proporciona la base para el soporte interno del cuerpo y para la unión de los músculos y tendones (Bloom y Fawcett, 1994).



El hueso y el cartílago son tejidos conectivos altamente especializados que están diseñados por naturaleza para realizar una variedad de tareas especializadas (Walsh *et al.*, 2003). Como resultado, estos tejidos tienen constituyentes celulares únicos y una organización ultraestructural que ayudan a optimizar las demandas bioquímicas y las cargas biomecánicas (Walsh *et al.*, 2003). Nuestra comprensión de estos tejidos conectivos ha aumentado en los últimos siglos, y el progreso continúa a medida que se definen y mejoran las técnicas o se desarrollan otras nuevas (Walsh *et al.*, 2003).

Para entender e interpretar la histomorfología del hueso, se torna esencial comprender la biología de la creación de sus estructuras (Stout y Crowder, 2012). Existe un potencial de desarrollo considerable en el campo de la histomorfología del hueso, tal como se aplica a los tejidos procedentes de contextos arqueológicos (Pfeiffer y Pinto, 2012). Una limitación importante para el uso de la histomorfología es nuestra falta de comprensión de las complejidades de la biología ósea (Pfeiffer y Pinto, 2012). Los investigadores en este campo todavía tienen que identificar todos los reguladores bioquímicos y las vías que controlan la formación y destrucción del hueso (Pfeiffer y Pinto, 2012).

El hueso es un complejo compuesto calcificado, vivo y biológico que existe en muchos niveles (Walsh *et al.*, 2003). Es esta organización jerárquica, desde el nivel macroscópico hasta el nivel ultraestructural de los componentes orgánicos e inorgánicos, la que hace que este tejido tenga un gran potencial de estudio (Walsh *et al.*, 2003). Las relaciones espaciales y la distribución de los aspectos celulares y estructurales reflejan la naturaleza compleja de este tejido (Walsh *et al.*, 2003).

El metabolismo óseo, ya sea para el crecimiento, la adaptación o la homeostasis, involucra tres tipos básicos de células: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Owen, 1978; Young y Heath, 2001). Los osteoblastos intervienen en



la mineralización y se disponen a lo largo de los huesos. Los osteocitos, osteoblastos inactivos atrapados en el interior del hueso, ayudan en la nutrición del hueso. Los osteoclastos, células fagocitarias capaces de erosionar el hueso, junto con los osteoblastos son encargados del recambio y remodelación del hueso (Young y Heath, 2001; Stout y Crowder, 2012). El modelado óseo está esencialmente restringido al esqueleto en crecimiento, donde trabaja en conjunto con el crecimiento para adaptar los huesos a su entorno biomecánico cambiante, ajustando la cantidad y la distribución espacial del tejido óseo (Stout y Crowder, 2012). La remodelación ósea es un proceso de renovación ósea que dura toda la vida y es el proceso predominante en el esqueleto adulto responsable de sus características histomorfológicas (Stout y Crowder, 2012). La remodelación ósea ocurre en todas las envolturas óseas (superficies), incluyendo el endostio (capa que envuelve las estructuras internas del hueso) y las trabéculas (Young y Heath, 2001; Stout y Crowder, 2012).

3.3.2- El hueso compacto, osteón y canal de Havers

El hueso compacto está formado por columnas óseas paralelas, que, en los huesos largos, se dispone siguiendo el eje mayor (Young y Heath, 2001). Forma una especie de cilindro que rodea la cavidad hematopoyética de los huesos largos (Eurell, 2004). Cada una de estas columnas presenta capas óseas concéntricas o laminillas, posicionadas alrededor de un canal central que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios (Young y Heath, 2001). Todo el tejido está organizado en pequeñas unidades cilíndricas llamadas osteonas (Eurell, 2004). Las láminas intersticiales llenan el espacio entre las osteonas mientras que las láminas circunferenciales cubren la superficie exterior e interior del hueso



compacto (Eurell, 2004). Los canales que están dentro de las osteonas, son canales neurovasculares y reciben el nombre de canales de Havers o canales haversianos (Young y Heath, 2001). Junto con las laminillas concéntricas, forman los sistemas de Havers (Young y Heath, 2001).

Las osteonas, y los canales de Havers, se definen por:

- **Osteón:** cada osteón está formado por láminas concéntricas o laminillas que rodean un canal central (Fig. 3.5 B). Los osteocitos se localizan dentro de las lagunas entre las láminas (Eurell, 2004). Las osteonas u osteonas secundarias (Fig. 3.5 B), llamados así en el estado de desarrollo completo (adulto) de un animal, están generalmente orientados en el eje largo del hueso tubular (Stout *et al.*, 1999). La arquitectura 3D de un osteón secundario es la de columnas cilíndricas ramificadas (Stout *et al.*, 1999). Hay varios tipos de osteonas, las osteonas de tipo I, tipo II (incrustados) y las osteonas de doble zona. Las osteonas tipo I son osteonas secundarias comunes y son típicamente el foco de la mayoría de los métodos de estimación histológica de la edad debido a su acumulación con la edad (Ericksen, 1991). Un osteón secundario menos común es el tipo II u osteón incrustado, que aparece como un osteón más pequeño separado con su propia línea de inversión dentro de un osteón secundario más grande (Ericksen 1991). Las osteonas de doble zona, otro osteón secundario menos común, presentan un anillo hipercalcificado (Stout y Crowder, 2012).

Aproximadamente dos tercios del volumen cortical están formados por osteonas secundarias intactas (Torben y Hauge, 2003). El resto está formado por hueso intersticial, que representa los restos de las generaciones anteriores de osteonas secundarias, y una capa continua de



unas pocas láminas en las superficies, denominadas láminas subperiósticas y subendósicas circunferenciales (Torben y Hauge, 2003).

- **Canal de Havers:** Los canales de Havers están conectados entre sí y se comunican con el periostio y con la cavidad de la médula a través de los canales transversales y oblicuos conocidos como canales de Volkmann (Torben y Hauge, 2003) (Fig. 3.5 B). El sistema canalicular se extiende a lo largo de las láminas. Una línea de cemento limita el margen exterior del osteón (Fig. 3.5 C). Los vasos sanguíneos y los nervios están localizados en el canal central (Eurell, 2004). Los haces neurovasculares establecen interconexiones entre sí y con el endostio y el periostio a través de los canales de Volkmann, que corren en ángulo recto con los canales centrales de Havers (Young y Heath, 2001; Eurell, 2004). En el centro del osteón secundario está el canal de Havers, con uno o dos capilares forrados por endotelio fenestrado rodeados por una lámina basal (Torben y Hauge, 2003). Por lo general, también hay algunas fibras nerviosas mielinizadas ocasionales y no mielinizadas (Robey y Boskey, 1996). Las láminas óseas concéntricas se centran alrededor de este canal. En la periferia, el osteón secundario está claramente delimitado del hueso circundante por una línea de cemento, que es una región de mineralización reducida que contiene sustancias mucosas sulfatadas (Torben y Hauge, 2003).

Otro tipo de hueso es el hueso esponjoso (Fig. 3.5 A), el que está formado por trabéculas óseas rodeadas de un espacio hematopoyético que contiene médula



ósea o tejido adiposo (Fig. 3.5 A). Las trabéculas son estructuras avasculares de hueso laminar y en ellas no hay osteonas presentes (Eurell, 2004). Los osteocitos de hueso esponjoso se localizan en un sistema lacunar-canalicular similar al hueso compacto. Los osteoblastos y osteoclastos de hueso esponjoso están presentes en la superficie de las trabéculas (Eurell, 2004).

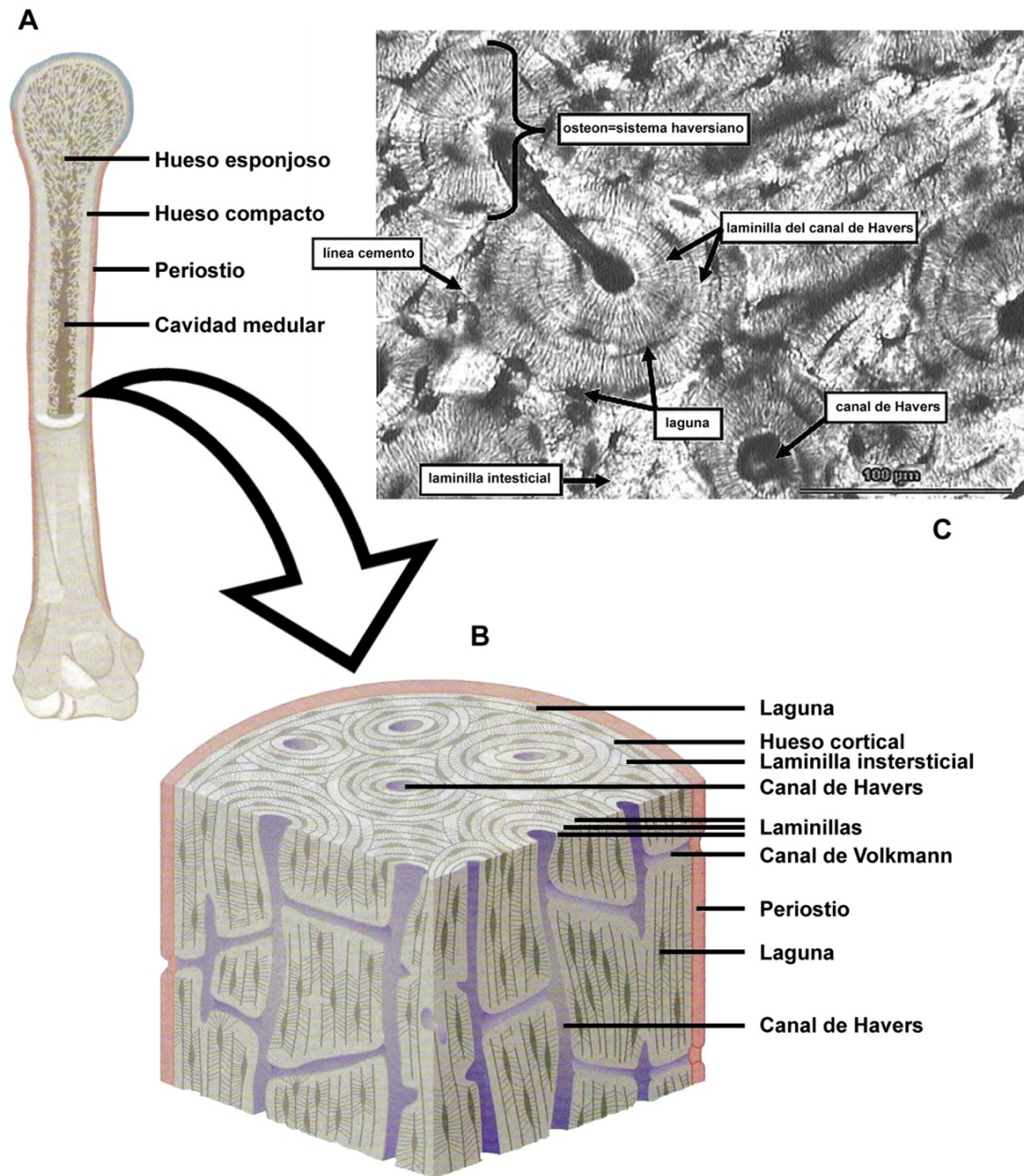


Figura 3.5- Esquema de las estructuras óseas internas del hueso. **A.** hueso largo, **B.** corte de la zona del hueso con osteonas y canales de Havers, **C.** corte transversal de hueso largo, se observan osteonas y canal de Havers (modificado de Young y Heath, 2001; Urbanová y Novotný, 2005).



3.4- Morfometría geométrica

En el inicio de las observaciones científicas, las descripciones de la forma de un organismo o partes de él, se hacían cualitativamente (Zeldicht *et al.*, 2004). La descripción morfológica se centró en la estructura observada: tejidos, células, órganos, dimensiones, formas, relaciones entre ellos, etc. (Rohlf, 1998; Toro *et al.*, 2010). Podían compararse con alguna forma reconocible, usando términos como en forma de círculo, forma alargada, fusiforme, entre otros (López-Galan, 2015). La descripción anatómica y morfológica de los seres vivos para analizar diferencias entre las especies, es la base desde los inicios de la biología (Adams *et al.*, 2013). Las comparaciones entre grupos o poblaciones estaban basadas en el análisis de las diferencias de sus dimensiones lineales, la forma era estimada como una cualidad de la estructura, la que podía describirse, pero no ser analizada cuantitativamente (Toro *et al.*, 2010). Los enfoques morfométricos tradicionales están basados en análisis multivariantes de colecciones arbitrarias de medidas de distancia, relaciones y ángulos que representan típicamente solo una parte de la información en que se basan las mediciones (Rohlf, 1999).

En las siguientes décadas, el avance de las tecnologías y la estadística ayudaron a que la descripción de la forma pasara a la cuantificación, los parámetros entre grupos de estudio y control fue posible relacionarlos y encontrar asociaciones que permitieran explicar sus diferencias (Toro *et al.*, 2010).

La morfometría geométrica (MG) difiere de la morfometría lineal (ML) o tradicional, porque la primera estudia los cambios, por medio de los desplazamientos, en el plano o en el espacio de un conjunto de puntos discretos denominados *landmarks* (Van der Molen *et al.*, 2007) (Fig. 3.6). Además, crea figuras que grafican las diferencias entre las muestras, y genera variables de la forma que están en conformidad con los análisis estadísticos (Adams *et al.*, 2004).



Esta es una de sus principales ventajas, ya que permite el estudio de la forma manteniendo su configuración geométrica intacta, en vez de estudiar a la forma como una serie de medidas lineales difícilmente relacionables entre sí, se considera a la forma en su totalidad, como existe realmente en la naturaleza (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Uno de los conceptos fundamentales en MG es la forma, propiedad geométrica de un objeto que no toma en cuenta la escala, rotación y traslación (Kendall, 1977; Bookstein, 1996). El efecto del tamaño en los estudios biométricos ha sido un tema de preocupación tanto en ML como en MG (Toro *et al.*, 2010).

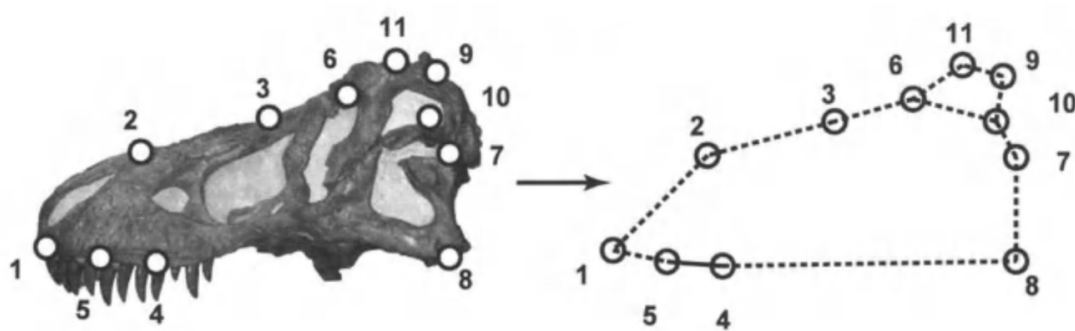


Figura 3.6- A la izquierda, cráneo de *Tyrannosaurus rex* con *landmarks* marcados. A la izquierda, figura creada por los *landmarks* (tomada de Elewa, 2004).

La MG permite eliminar las diferencias que puedan existir en el tamaño entre muestras, permite ir más allá de la simple descripción de diferencias en forma que pudiera existir entre muestras, y tiene mayor precisión en la medición de la variación morfológica (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).

Aunque el concepto de forma se refiere a que la propiedad geométrica no varía por efecto del tamaño. En MG, no es posible analizar la “forma” de manera separada del “tamaño”, porque son características biológicas íntimamente ligadas, es decir, organismos de diferentes tamaños tendrán diferentes formas,



aunque sean de la misma especie, lo que es debido al crecimiento natural u ontogenético de los organismos vivos (Zeldicht *et al.*, 2004; López-Galan, 2015).

Zelditch *et al.* (2004) y Toro *et al.* (2010), dividen el estudio de la MG, en tres etapas:

- **Obtención de datos:** la obtención de los datos que se usarán, será por medio de toma de fotos (o imágenes 3D si es un escáner), selección y puesta de los puntos o *landmarks*. Los *landmarks* son lugares anatómicos, homólogos, que representan la morfología de todos los ejemplares del estudio y que han de ser reconocibles en cada uno de ellos. Además, deben proveer de una cobertura adecuada de la forma y deben ser ubicados fácil y repetidamente entre un organismo y otro.
- **Alineación de las formas:** esto es, como su nombre lo dice, la alineación de las formas y la obtención de las variables de la forma.
- **El análisis de los datos:** los datos que luego son sometidos a análisis, corresponden a los datos primarios. Para que el análisis de estos datos no arroje errores, la selección de los *landmarks* cobra real importancia. De ella depende no solo la confiabilidad de los resultados estadísticos, sino también la información que se pueda obtener de ellos. Así como la discusión de las implicaciones biológicas, de las variaciones observadas, muy importante en morfología funcional.



3.4.1- Tipos de landmarks

Según Bookstein (1991; 1997), Dryden y Mardia (1998) y Toro *et al.* (2010), los *landmarks* pueden ser:

- **Landmarks tipo 1:** son puntos establecidos en la conjunción de tres estructuras o intersecciones de curvas y también pueden estar en los centros de estructuras pequeñas. Un ejemplo de este tipo de *landmarks*, son las intersecciones de suturas o el centro de pequeños forámenes. Estos *landmarks* pueden ayudar a observar el desarrollo biológico de un organismo a lo largo de su crecimiento.
- **Landmarks tipo 2:** este tipo de *landmarks* se ubican en el máximo de una curva, donde hay aplicación de fuerzas biomecánicas, como las cúspides de los molares o la parte predominante de una tuberosidad donde se inserta algún tendón de un músculo.
- **Landmarks tipo 3:** la mayoría de los *landmarks* usados en MG, son de este tipo. Son ubicados en diámetros y largos máximos. Son *landmarks* asociados a los tamaños máximos.
- **Semi-landmarks:** se utilizan para el análisis de formas en donde es muy difícil ubicar *landmarks* homólogos. Corresponden a *landmarks* localizados en curvas y que pueden desplazarse levemente en ella.



- **Pseudo-landmarks:** corresponden a constructos definidos por términos matemáticos y anatómicos, como puntos tangentes a una curva.

Para seleccionar los *landmarks* es importante tener en cuenta ciertos parámetros. Los cuales se definen a continuación:

- **Homología:** deben ser homólogos, deben representar el mismo punto de la misma estructura en todos los individuos del estudio (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Bajo esta definición, los *landmarks* deben ser discretos, lo que quiere decir, que deben ser claramente diferenciables de las estructuras que los rodean, lo que permite la interpretación de la variación observada (Toro *et al.*, 2010).
- **Cobertura:** deben abarcar ampliamente la forma que se está estudiando. En algunos casos, puede no haber puntos discretos claramente identificables como homólogos en algunas regiones de la forma, aquí es donde se pueden incluir *semi-landmarks* (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Es importante que los *landmarks* cubran la forma que se está estudiando, porque de lo contrario, una mala cobertura puede incidir en una pérdida de información (Toro *et al.*, 2010).



- **Repetitividad:** los *landmarks* deben poder ser replicables en todas las muestras que se utilizarán en el estudio y de esta manera, evitar los errores de precisión en los análisis posteriores (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Para evitar un error significativo, es de importancia que el *landmarks* pueda ser ubicado fácil y se encuentre lo más claro posible (Toro *et al.*, 2010).
- **Coplanaridad:** analizar la fotografía plana de un animal que no tiene mucha complejidad anatómica y que la mayoría de sus *landmarks* están en un plano antero-posterior, no es lo mismo que el análisis de una fotografía de un cráneo en vista lateral, donde los *landmarks* de importancia están en los planos medios y paramedianos (Toro *et al.*, 2010). La ausencia de este problema es una de las ventajas que presenta el análisis en 3D de los datos (Toro *et al.*, 2010).
- **Consistencia en la posición relativa:** Los *landmarks* no deben intercambiar su posición relativa original con otros *landmarks* de una imagen a otra imagen; es decir, deben ser siempre los mismos y en la misma posición relativa a lo largo de todas las imágenes (de todos los especímenes analizados) (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).



3.4.2- Configuración de Consenso, Superposición de Procrustes y Distancia de Procrustes

A continuación, se definen y explican los términos más usados en MG:

- **Configuración Consenso:** La Configuración Consenso (o forma consenso) es el promedio de todas las formas (configuraciones de *landmarks*) en el análisis. Se interpreta como la representación promedio de la forma de los especímenes en el estudio (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). También, se puede estimar una configuración consenso para cada muestra (o grupo) y usar estas en los análisis en casos en que se esté examinando muchas muestras, o grupos diferentes (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).
- **La Superposición de Procrustes:** se basan en la idea de superponer las imágenes de dos o más especímenes para que sus puntos de referencia homólogos coincidan lo más cerca posible de acuerdo con un criterio de optimización (Rohlf y Marcus, 1993). Luego, se informa de cualquier diferencia en la forma en términos de residuos, que generalmente se muestra gráficamente como vectores de desplazamiento en cada punto de referencia (Rohlf y Marcus, 1993). Al fotografiar (o escanear si es 3D) especímenes que se quieren investigar, habitualmente nunca están en la misma posición. Las diferencias de cómo están ubicados los especímenes no son de interés biológico, pero pueden afectar el análisis de la forma. Las diferencias en el tamaño de los especímenes, que no forman parte de la variación en la forma, también pueden afectar la ubicación de los *landmarks* en las fotos o los escaneados 3D (Aguirre y Jiménez-Prado,



2018). El objetivo de la superimposición o alineación es eliminar la tergiversación que pueda presentarse en los especímenes relacionada con las diferencias en su ubicación, en su rotación, en el tamaño en las fotos o los escaneados 3D (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Para eliminar las variaciones de posición, todas las configuraciones se traducen de modo que sus centros de gravedad estén en el origen del sistema de coordenadas y, finalmente, todas las configuraciones giran en torno a este centro de gravedad común (Klingenberg, 2010) (Fig. 3.7). Después de esta alineación, las diferencias que puedan registrarse entre las coordenadas de los *landmarks* homólogos, corresponderán a aquellas diferencias en la forma existente entre especímenes (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Los datos de forma resultantes, se pueden utilizar para análisis con las herramientas habituales de estadística multivariada (Klingenberg, 2010). Finalmente, el Análisis de Procrustes, describe un conjunto de herramientas matemáticas que permiten la comparación de dos configuraciones de puntos homólogos provenientes de dos variantes de la misma entidad, como pueden ser dos individuos dentro de una población, dos especies, etc. (Torcida y Perez, 2012). El objetivo del análisis es determinar si las representaciones alternativas de los mismos n puntos homólogos muestran diferentes relaciones internas entre ellos (Torcida y Perez, 2012).

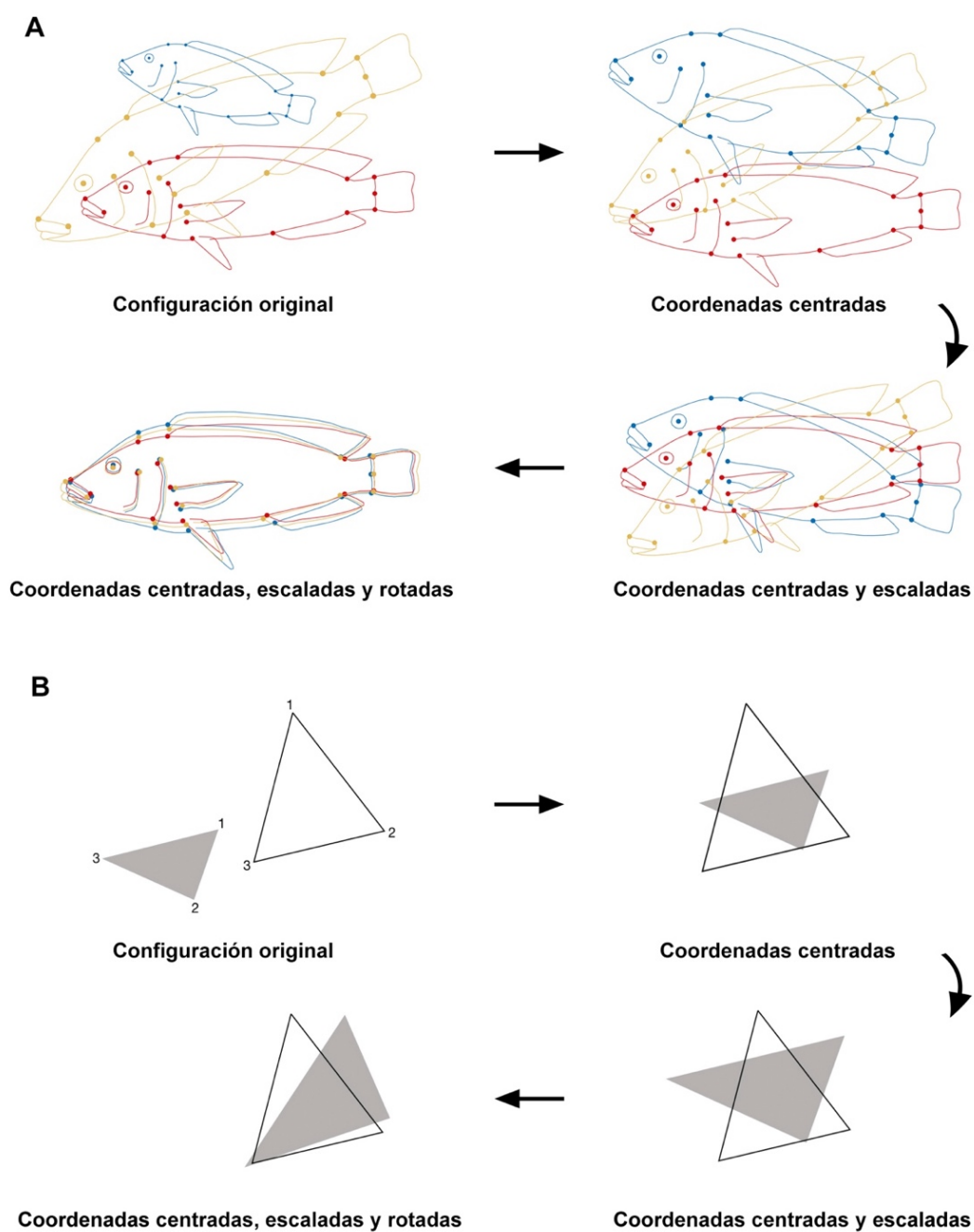


Figura 3.7- Representación de los pasos del Análisis de Procrustes. **A.** con los *landmarks* en un pez y en **B.** con un triángulo (tomado de Klingenberg, 2010 y Torcida y Perez, 2012).



- **La Distancia de Procrustes:** la medida habitual de la diferencia de forma, entre dos configuraciones de puntos de referencia superpuestas, se denomina Distancia de Procrustes (Baab *et al.*, 2012). Es una medida de gran utilidad en la MG, representa la suma de las distancias cuadradas entre *landmarks* homólogos, después que las formas han sido alineadas y escaladas, lo que permite eliminar la variación que no corresponde a la forma (Baab *et al.*, 2012). Esta distancia es la raíz cuadrada de la suma de todas las distancias cuadradas entre los puntos de referencia correspondientes en los dos objetos superpuestos (Baab *et al.*, 2012; Torcida y Perez, 2012). Por lo tanto, la Distancia de Procrustes es una medida de las diferencias en la forma, así tenemos que una distancia más grande implica una magnitud mayor de la diferencia de forma, mientras que una distancia de cero indica que las dos formas son idénticas (Baab *et al.*, 2012). Además, de formar parte del proceso de la Superposición de Procrustes, es la medida de distancia más comúnmente usada en la MG. Se puede usar como una medida de diferencia entre dos especímenes o entre configuraciones consenso de muestras o especies diferentes (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).



4- EL MATERIAL Y TÉCNICA USADA PARA EL ANÁLISIS



4.1- Introducción al material de estudio

Producto del trabajo de gabinete, se obtuvieron una lista de museos e instituciones de América y Europa, que custodiaban fósiles susceptibles de ser analizados. Las muestras usadas en los análisis moleculares y de histomorfometría, fueron colectadas en el transcurso de los primeros dos años del Doctorado. Para la recolección se contactó con los diferentes conservadores de las áreas de interés de cada museo y se solicitó, atendiendo a los requerimientos de éstos, muestras por correo postal o permiso para ir a retirar material de los fósiles de interés.

Los acrónimos, las Instituciones y el país al cual pertenecen, se detalla en la tabla 4.1.

Acrónimo	Institución	Origen del fósil
NMMNHS	New Mexico Museum of Natural History and Science	USA
MPG	Museo Paleontológico de Guadalajara "Federico A. Solórzano"	México
MUHNES	Museo de Historia Natural de El Salvador	El Salvador
NMB	Natural History Museum of Basel	Nicaragua/Venezuela/ Trinidad
MNCC	Museo Nacional de Costa Rica	Costa Rica
EPN	Escuela Politécnica Nacional de Quito	Ecuador
MNB	Museum Für Naturkunde Berlin	Bolivia
PIMUZ	Palaeontological Institute and Museum at the University of Zurich, Switzerland	Argentina
MPPCh	Museo Pleistocénico Parque Chuyaca	Chile
UACH	Universidad Austral de Chile	Chile
MNHN	Museo Nacional de Historia Natural de Chile	Chile
MF	Museo Fonck, Viña del Mar	Chile
MRA	Museo Regional de la Araucanía de Temuco	Chile
MUSA	Museo de Historia Natural e Histórico de San Antonio	Chile
MHNV	Museo de Historia Natural de Valparaíso	Chile
MHAMVM	Museo Histórico y Antropológico Maurice Van de Maele	Chile
MHMO	Museo Histórico Municipal de Osorno	Chile
MMCCCh	Museo Municipal de Castro-Chiloé	Chile

Tabla 4.1- Instituciones que facilitaron muestras de fósiles de gonfoterio para esta investigación. Se muestran las siglas de las Instituciones y la procedencia de las colecciones.



4.2- Análisis del colágeno (I) por espectrometría de masa

4.2.1- Muestras analizadas:

Para maximizar el porcentaje de éxito en el análisis del colágeno (I), los fósiles seleccionados han sido: raíces de molares, dentina de la defensa y los sectores más compactos de los fósiles de cráneo, mandíbulas, costillas y pelvis.

El detalle de las muestras se puede ver en la tabla 4.2 y en el mapa de la figura 4.1.

Especie	Fósil	Localidad	País	Nº de colección	Institución
<i>Stegomastodon</i> sp.	Dentina de molar	South Monticello Point, New México	USA	NMMNH-P-46496	NMMNHS
<i>Cuvieronius</i> sp.	Dentina de molar	Las Cruces	USA	NMMNH-P-27232	NMMNHS
<i>C. hyodon</i>	Raíz de molar	Zacoalco	México	MPG-R-1052	MPG
<i>S. platensis</i>	Raíz de molar	Santa Cruz de la Soledad	México	MPG-PD-001	MPG
<i>S. platensis</i>	Pelvis	Santa Cruz de la Soledad	México	MPG-PD-001	MPG
<i>C. hyodon</i>	Dentina de molar	Apopa, San Salvador	El Salvador	70-1169	MUHNES
<i>C. hyodon</i>	Mandíbula	Apopa, San Salvador	El Salvador	70-2099	MUHNES
<i>C. hyodon</i>	Mandíbula	Apopa, San Salvador	El Salvador	70-1164	MUHNES
<i>C. hyodon</i>	Mandíbula	Apopa, San Salvador	El Salvador	70-1139	MUHNES
<i>Cuvieronius</i> sp.	Mandíbula	Barranca de Sisimico, San Vicente	El Salvador	70-0006	MUHNES
<i>Cuvieronius</i> sp.	Dentina de molar	Barranca de Sisimico, San Salvador	El Salvador	70-0005	MUHNES
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Ocotol	Nicaragua	S.A.i	NMB
<i>C. hyodon</i>	Defensa	Buenos Aires	Costa Rica	CFM-3771	MNCC
<i>C. hyodon</i>	Dentina de molar	Tibás, San José	Costa Rica	26389	MNCC
<i>C. hyodon</i>	Costilla	Río Nacaome, Nicoya	Costa Rica	G-24NC CFM-1390	MNCC
Gonfoterio indet.	Raíz molar	Quebrada Ocando, Distrito Falcón	Venezuela	Sin n° colección	NMB
<i>C. hyodon</i>	Raíz de molar	Los Bajos	Trinidad	S.A. 196.	NMB
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Los Bajos	Trinidad	S.A. 196. (A)	NMB
<i>Stegomastodon</i> sp.	Dentina de molar	Río Chiche	Ecuador	v-1236	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	San Vicente-Checa	Ecuador	v-1240	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	La Carolina	Ecuador	v-3843	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	La Carolina	Ecuador	v-3844	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	La Carolina	Ecuador	v-3973	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	Quebrada Colorada	Ecuador	v-4261	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	Quebrada Santa Ana, La Merced	Ecuador	v-4471	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	Fm. Cangagua	Ecuador	v-4472	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	Quebrada Santa Ana, La Merced	Ecuador	v-4473	EPN
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Fm. Cangagua	Ecuador	v-4821	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	Fm. Cangagua	Ecuador	v-4823	EPN



Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Río California, Cuzubamba	Ecuador	v-5780	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	Volcán Ilaló	Ecuador	v-6132	EPN
<i>S. waringi</i>	Dentina de molar	La Merced	Ecuador	v-6144	EPN
<i>C. hyodon</i>	Dentina de molar	Valle Central de Tarija	Bolivia	MB.Ma. 13664	MNB
<i>C. hyodon</i>	Raíz de molar	Valle Central de Tarija	Bolivia	MB.Ma. 13666	MNB
<i>C. hyodon</i>	Defensa	Valle Central de Tarija	Bolivia	MB.Ma. 45524	MNB
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Barranca San Lorenzo, Tonelero	Argentina	PIMUZ A/V 4105	PIMUZ
Gonfoterio indet.	Mandíbula	Arroyo Dulce	Argentina	PIMUZ A/V 4092	PIMUZ
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Arroyo del Medio 1	Argentina	PIMUZ A/V 4136	PIMUZ
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Arroyo Pergamino	Argentina	PIMUZ A/V 4161	PIMUZ
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Desconocido	Argentina	PIMUZ A/V 4279	PIMUZ
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Río Bueno	Chile	SGO-PV-44	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Tagua-Tagua	Chile	SGO-PV-47C	MNHN
Gonfoterio indet.	Cráneo	Tagua-Tagua	Chile	Sin n° colección	MNHN
Gonfoterio indet.	Costilla	Tagua-Tagua	Chile	SGO-244C	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Tagua-Tagua	Chile	47A	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Tagua-Tagua	Chile	SGO-PV-47K	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Tagua-Tagua	Chile	TT2 B	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Cauquenes, Parral	Chile	SGO-PV-19	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Quilpue	Chile	Sin n° colección	MF
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Quilpue	Chile	Sin n° colección	MF
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	San Pablo	Chile	SGO-PV-43	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Los Vilos	Chile	267A	MNHN
Gonfoterio indet.	Costilla	Chillan	Chile	SGO-11	MNHN
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Alto Boroa	Chile	Z462	MRA
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Popuya, Navidad	Chile	MUSA1637	MUSA
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Casa Blanca	Chile	Sin n° colección	MHNV
Gonfoterio indet.	Raíz de Molar	Monte Verde	Chile	A02147	MHAMVM
Gonfoterio indet.	Costilla	Monte Verde	Chile	GEOUACH126	UACH
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Frutillar	Chile	GEOUACHP/FR/21	UACH
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	La Plata	Chile	GEOUACHP/LP/13	UACH
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	La Plata	Chile	GEOUACHP/LP/14	UACH
Gonfoterio indet.	Mandíbula	El Trébol	Chile	GEOUACHP/TR/19	UACH
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Máfil	Chile	GEOUACHP/LL/2	UACH
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Choroico	Chile	GEOUACHP/MA/1	UACH
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Huilma	Chile	MHMOP/HU/12	MHMO
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Nochaco	Chile	MHMOP/NO/11	MHMO
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Nochaco	Chile	MHMOP/NO/9	MHMO
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Mulpulmo	Chile	MHMOP/MU/4	MHMO
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Lomas Blancas	Chile	MUMOP/LB/13	MHMO
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Chiloé-Castro	Chile	Sin n° colección	MMCCCh

Tabla 4.2- En esta tabla se observa las 70 muestras usadas en la investigación, su procedencia, número de colección, coordenadas de la zona de hallazgos e institución en la cual se encuentra la colección.



Figura 4.1- Mapa que indica las zonas geográficas de donde son originarios los hallazgos fósiles usados en este estudio.



4.2.2- Técnica a emplear:

Los fragmentos de muestras que se usaron fueron de aproximadamente de 1cm³ (Fig. 4.2).



Figura 4.2- Fragmentos de fósiles de gonfoterio de América. Los fragmentos corresponden a fósiles de dentina, defensa y hueso. El tamaño de las muestras corresponde a 1cm³ aproximadamente.

Preferentemente se cortaron fragmentos de la cortical del hueso, fragmentos de raíz de molar y dentina (de defensa o de molar). De estas muestras se selecciona aproximadamente 1 a 2 gramos y se depositan en tubos eppendorf. Cuando el fragmento de fósil es muy duro, se extrae polvo de él con un taladro tipo Dremel.



Posteriormente, en los tubos eppendorf se les deposita 1ml de HCL a 0.6M a una temperatura de 4°C por 18 a 20 horas, para desmineralizar la muestra (Fig. 4.3).

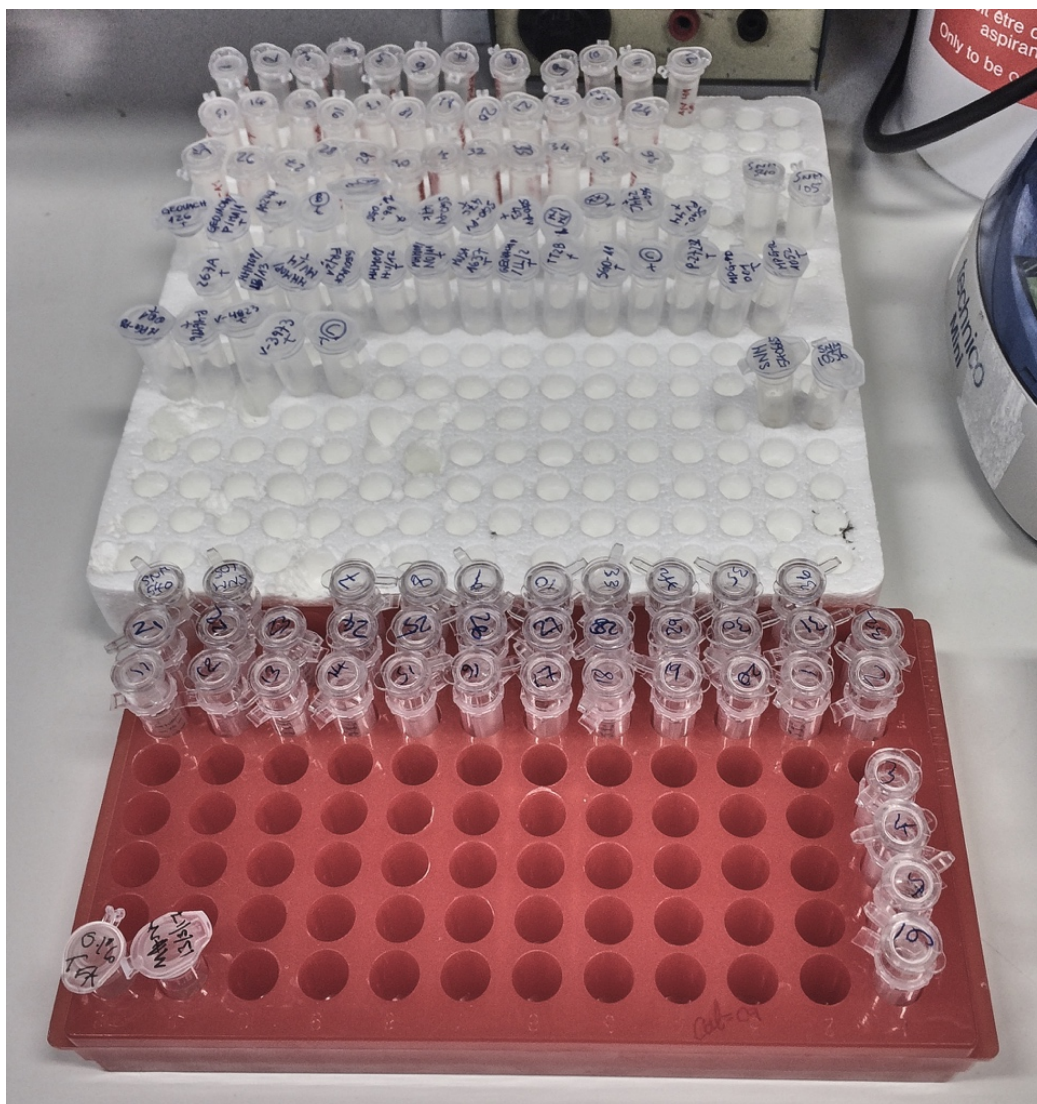


Figura 4.3- Muestras de gonfoterio con 1ml de HCL a 0.6M, recién retiradas del refrigerador a 4°C por 18 a 20 horas.

A continuación, las muestras son centrifugadas durante 1 o 2 minutos a 12,000g. Se retira del tubo una muestra de 500 μ L y se depositan en frascos de ultrafiltración. Se colocan en un porta eppendorf, uno en frente del otro, y se



enumeran los frascos de ultrafiltración y frasco con muestra (arriba en la tapa). Los frascos de ultrafiltración se centrifugan a 12.000g aproximadamente durante 20 minutos. Tras centrifugar las muestras, se sacan y se retira el líquido que quedó en el frasco exterior (sobrenadante). Se procede a tomar más solución del tubo de la muestra, se deposita en el frasco de ultrafiltración y se vuelve a centrifugar a 12.000g aproximadamente durante 20 minutos más. Al terminar, se retira el sobrenadante de los frascos exteriores, tal como se hizo con anterioridad. A continuación, a todos los frascos de ultrafiltración, se les introduce bicarbonato de amonio 50 mM. Se centrifuga por 15 minutos aproximadamente y se retira el contenido que se deposita en el frasco externo del filtro. Después, se extrae el contenido de los frascos de ultrafiltración con micropipeta y se pone en otro tubo eppendorf. Se resuspende en 80 μ L 50 mM de bicarbonato de amonio y se deposita en el nuevo frasco con las muestras (se “pipetea” dentro del tubo, para homogenizar la muestra) y se retira una cantidad (la misma que se puso de amoniaco) sobre otro tubo eppendorf. A los nuevos tubos eppendorf se les pone el código original de la muestra (número de identificación de museo), debido a que los tubos de ultrafiltración solo tenían un número. Ahora, a cada nuevo tubo con muestra diluida, se les introduce 0,4 μ g de Tripsina, cuya función es “cortar” la acción del colágeno (digestión). Se incuba por toda la noche (18 h.) a 37°C. Se extraen las muestras del baño (37°C) y se introducen en un porta eppendorf. Luego se situá otro eppendorf en frente de cada una de los eppendorf con muestras. En esos nuevos tubos, situados frente a las muestras, se deposita 0,1 % TFA (ácido trifluoroacético) 1900 μ L. Al finalizar, se añade el TFA a todos los nuevos tubos, se saca 1 μ L de la muestra y se mezcla con el TFA, se “pipetea” (homogeniza la muestra) y se retira 1 μ L de esa mezcla para depositarla en una grilla que tiene coordenadas cartesianas (Fig. 4.4).



Figura 4.4- Depositando las muestras de gonfoterio en la grilla.

Sobre esa gota se deposita 1 μL de muestra junto con 1 μL de α -cyano-4-solución de ácido hidroxicinámico (1% en ACN/ H_2O 1:1 v:v) y se deja secar. Luego se procede a introducir las muestras en el espectrómetro Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) en modo reflectrón utilizando un Bruker ultraflex III MALDI TOF/TOF espectrómetro de masa (Fig. 4.5). Todos los análisis se hicieron en Buckley Lab, Manchester Institute of Biotechnology de la Universidad de Manchester, Reino Unido. Para visualizar los espectros obtenidos se usó el programa mMass versión 5.5.0.

El esquema del proceso completo, se puede observar en la figura 4.6.

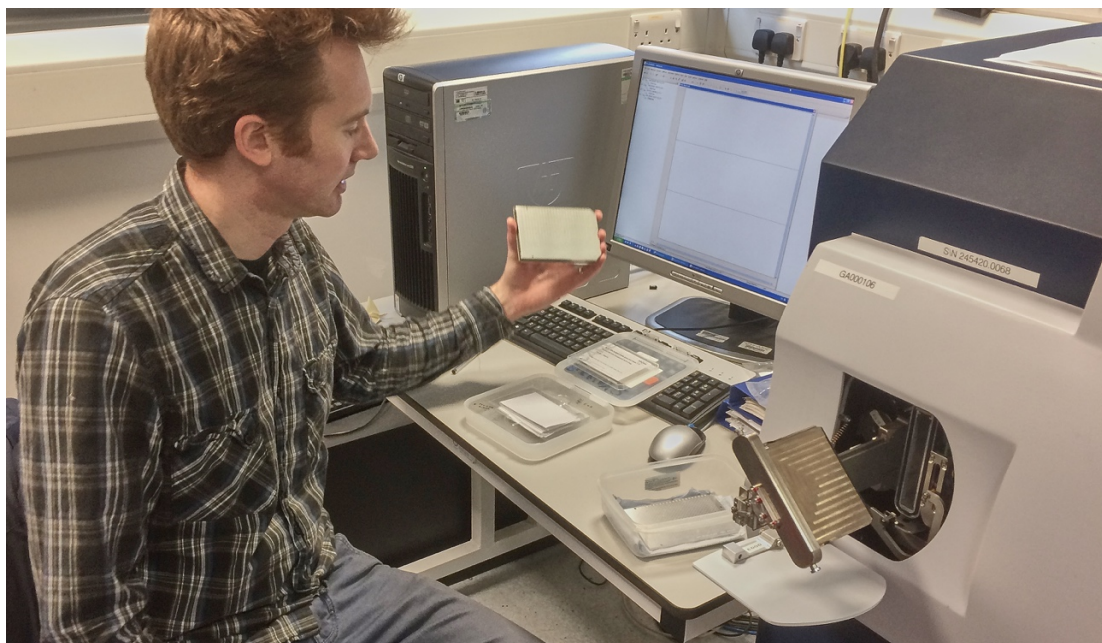


Figura 4.5- Instantes antes de introducir la grilla con muestras de gonfoterio en el Bruker ultraflex III MALDI TOF/TOF espectrómetro de masa.

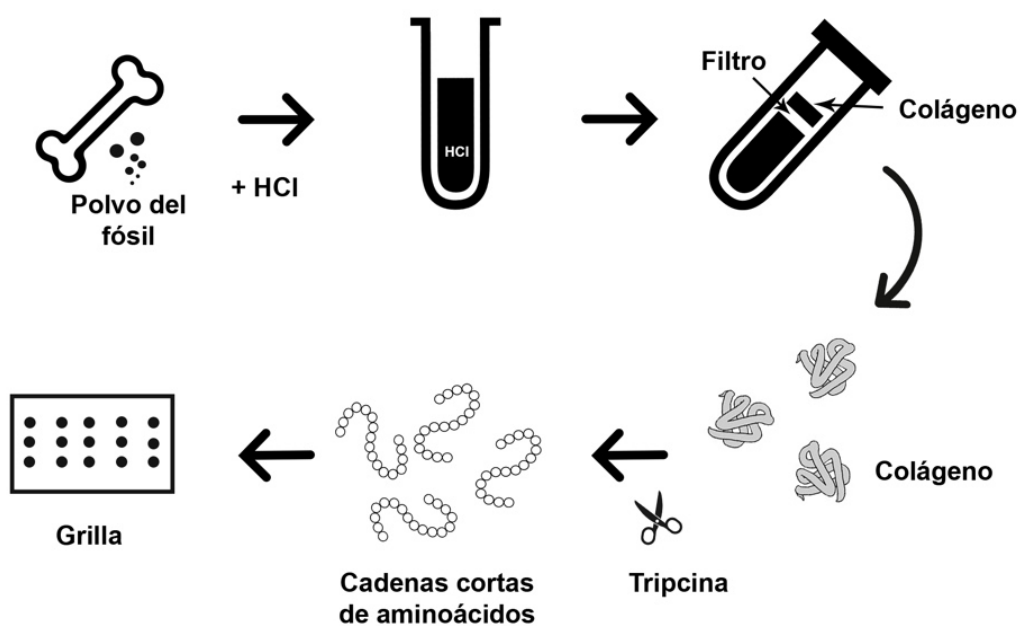


Figura 4.6- Diagrama del proceso en el laboratorio para obtener el colágeno (I), hasta que se sitúa en la rejilla donde será leído por el espectrómetro de masa.



4.3- Histomorfometría de los canales de Havers y osteonas

4.3.1- Muestras usadas:

Se hicieron láminas delgadas de las 70 muestras colectadas para los análisis de esta tesis, y solo fue posible usar 11 muestras que tuvieran la estructura cortical apta para este estudio. Las muestras que se usaron, están en la tabla 4.3. Corresponden a fósiles de hueso del esqueleto axial y cintura pélvica principalmente. En total fueron 1 de México, 3 de El Salvador, 1 de Costa Rica y 6 de Chile. Para este estudio se consideraron a *S. platensis* (MPG-PD-001) y a *N. platensis* (UACH.PV.TR.19) como especies separadas.

País	Código	Elemento esquelético	Especie
México	MPG-PD-001	Coxal	<i>S. platensis</i>
El Salvador	70-1164	Mandíbula	<i>C. hyodon</i>
El Salvador	70-1169	Mandíbula	<i>C. hyodon</i>
El Salvador	70-2099	Mandíbula	<i>C. hyodon</i>
Costa Rica	G-24NC	Costilla	<i>C. hyodon</i>
Chile	s/n	Cráneo	Gonfoterio indet.
Chile	GEOUACH126	Costilla	Gonfoterio indet.
Chile	MUSA 1637	Mandíbula	Gonfoterio indet.
Chile	SGO-11	Costilla	Gonfoterio indet.
Chile	SGO-244C	Costilla	Gonfoterio indet.
Chile	UACH.PV.TR.19	Mandíbula	<i>N. platensis</i>

Tabla 4.3- País, código de museo, elemento esquelético y especie de las muestras que se usaron en este estudio.



4.3.2- Técnica a emplear:

Para hacer las láminas delgadas, se siguió el protocolo de Reed y Mergner (1953) y Tucker (1988). Las láminas delgadas fueron fotografiadas con microscopio petrológico de luz transmitida Leica DMLP, con una cámara digital Leica DC300 acoplada al microscopio y conectada a un ordenador con el programa informático Leica Application Suite (LAS), usando el objetivo 4x. Las láminas delgadas y las fotografías se hicieron en el Departamento de Geodinámica, Estratigrafía y Paleontología de la Universidad Complutenses de Madrid. Se midieron perímetros, diámetros y áreas de las osteonas y perímetros, diámetros, áreas y distancias de los canales de Havers (Fig. 4.7), siguiendo a Nganvongpanit *et al.* (2015). Para las mediciones, se usó el programa ImageJ versión 2.0.0-rc-68/1-52e de libre acceso (<https://imagej.net/Welcome>). De todos los datos, solo algunos fueron escogidos mediante la función de toma de muestras aleatoria del programa Excel versión 16.24 (todas las mediciones se pueden ver en el anexo III). La selección de datos, se hizo con el fin de equilibrar la cantidad de medidas para los grupos y que esto no contribuyera a fomentar el margen de error en los análisis estadísticos. Los análisis estadísticos se hicieron con el programa IBM® SPSS® Statistics versión 25.

4.3.2.1- Toma de las mediciones

Los parámetros a seguir para las mediciones, fueron los siguientes:



- I. No se midieron osteonas incompletas.
- II. Se midieron los límites muy demarcados y muy visibles de las osteonas.
- III. Se midieron solo las osteonas que denotaban morfologías sin deformaciones muy pronunciadas. De esta manera evitar los errores en la medición.
- IV. Para medir los canales de Havers, se midió el lumen del canal.
- V. Cuando dentro del canal de Havers hubo relleno, se midió la zona exterior del relleno.
- VI. Se evitó medir los canales de Havers con deformaciones o grietas.
- VII. Para medir las distancias entre los canales de Havers, se midieron los centros de cada canal cercano.

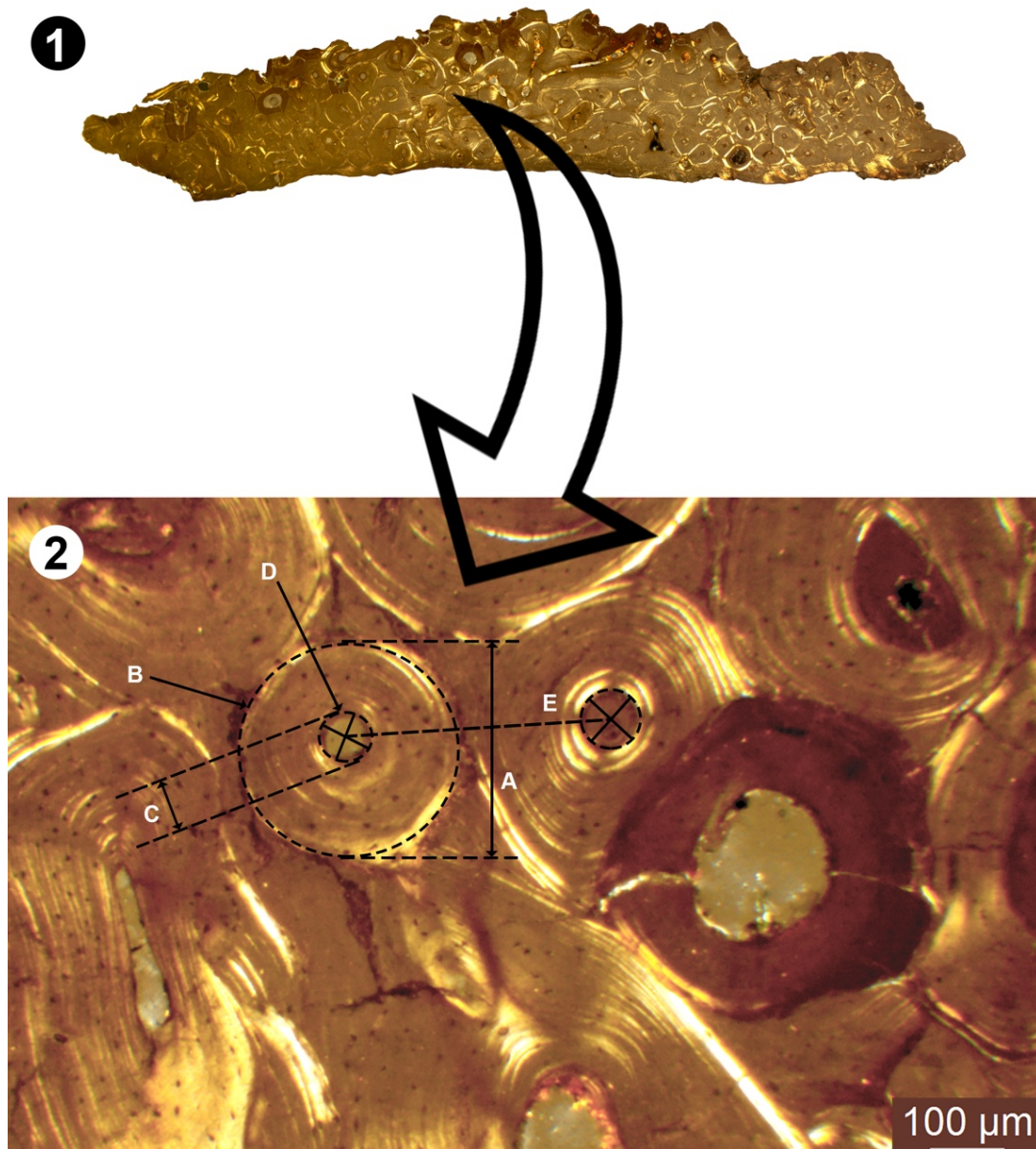


Figura 4.7- Arriba **1**. Corte histológico de fósil de costilla (GEOUACH126). Abajo **2**. Se muestran las mediciones que se usaron y los sectores que fueron medidos. **A.** Diámetro de la osteona, **B.** Perímetro de la osteona, **C.** Diámetro del canal de Havers, **D.** Perímetro del canal de Havers y **E.** Distancia entre los canales de Havers.



4.3.2.2- Manejo de los datos

Al tener todos los valores de las estructuras por cada lámina delgada, se procedió a escoger aleatoriamente una cantidad de datos del universo de medidas por muestra, específicamente: 15 para el área, perímetro y el diámetro del osteón; 18 para el área, perímetro y el diámetro del canal de Havers y 44 para la distancia entre los canales de Havers. Este procedimiento se hizo para equiparar el tamaño de datos por cada lámina delgada examinada.

4.4- Morfometría geométrica

4.4.1- *Muestras usadas:*

Se usaron fotografías de molares, de todas las publicaciones conocidas, hallados en distintas localidades y yacimientos de América. Solo se utilizaron las fotografías en vista cenital que mostraron molares enteros y en donde se apreciara la superficie oclusal, con escala métrica visible. Se utilizaron molares de los cuales se sabía exactamente su disposición en la serie dental, para obtener resultados lo más fidedignos posible. Se reagruparon en *Notiomastodon platensis* molares que estaban clasificados en otros taxones, como *Stegomastodon* aff. *Stegomastodon platensis* y otros que en la actualidad se sabe están adscritos a *Notiomastodon platensis*. Del total de publicaciones, solo fue posible usar 20 m3 lado derecho y 19 m3 lado izquierdo. El detalle de las muestras y la reagrupación de algunas, se puede ver en la tabla 4.4.



Especie	Tipo de diente	Número de colección	País y lugar del hallazgo	Publicación
<i>N. platensis</i> (antes <i>Stegomastodon</i> aff. <i>Stegomastodon platensis</i>)	m3 derecho	MHMOP/PI/15	Chile, Pilauco	Recabarren <i>et al.</i> (2014)
<i>N. platensis</i>	m3 derecho	MPAB-217	Uruguay, Arroyo Perico Flaco.	Perea y Alberdi (2015)
<i>N. platensis</i> (antes <i>S. waringi</i>)	m3 derecho	MOM 0001	Brasil, Balneário Hermenegildo.	Gadens (2007)
<i>N. platensis</i> (antes <i>S. waringi</i>)	m3 derecho	MAP 186	Brasil, Balneário Hermenegildo.	Gadens (2007)
<i>N. platensis</i> (antes <i>S. waringi</i>)	m3 derecho	MN 2602-V	Brasil, Balneário Hermenegildo.	Gadens (2007)
<i>N. platensis</i> (sinonimia <i>Haplomastodon chimborazi</i>)	m3 derecho	MECN 82	Ecuador, Bolivar.	Ferretti (2010)
<i>Stegomastodon</i> sp.	m3 derecho	IGCU677-CTO2c	México, Rancho El Ocote	Alberdi y Corona (2005)
<i>Stegomastodon</i> sp.	m3 derecho	IGCU408-CTO2c	México, Rancho El Ocote	Alberdi y Corona (2005)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	s/n	Guatemala, Chahal.	Lucas <i>et al.</i> (2016)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	UF 9741	USA, Punta Gorda	Lucas (2008a)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	DMA5 517	USA, Daytona Beach	Lucas (2008a)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	DMA5 694	USA, Daytona Beach	Lucas (2008a)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	UMPE 0608	México, Mazahua	Jiménez-Hidalgo y Pérez-Cruz (2014)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	INAH-MRG 10-295048	México, Lago Chapala	Lucas (2008b)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	MPG 731	México, Zacoalco	Lucas (2008c)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	INAH-MRG s/n	México, Lago Chapala	Lucas (2008b)
<i>C. hyodon</i>	m3 derecho	INAH-MRG 10-295048	México, Juchitlán	Lucas (2008c)
<i>C. tropicus</i>	m3 derecho	ISS AP6-1	El Salvador, Río Tomayate	Cisneros (2005)
<i>C. tropicus</i>	m3 derecho	ISS AP30-674	El Salvador, Río Tomayate	Cisneros (2005)
<i>C. tropicus</i>	m3 derecho	ISS AP30-593	El Salvador, Río Tomayate	Cisneros (2008)
<i>N. platensis</i> (antes <i>Stegomastodon</i> aff. <i>Stegomastodon platensis</i>)	m3 izquierdo	MHMOP/PI/14	Chile, yacimiento Pilauco.	Recabarren <i>et al.</i> (2014)
<i>N. platensis</i> (antes <i>S. platensis</i>)	m3 izquierdo	MNHN-909	Uruguay, campo de la viuda de Cannard.	Perea y Alberdi (2015)
<i>N. platensis</i> (antes <i>S. platensis</i>)	m3 izquierdo	MBR-s/n	Uruguay, Arroyo San Pedro.	Perea y Alberdi (2015)
<i>N. platensis</i> (antes <i>Stegomastodon</i> aff. <i>Stegomastodon platensis</i>)	m3 izquierdo	UACH.PV.CHO.01	Chile, Choroico.	Recabarren <i>et al.</i> (2014)
<i>N. platensis</i> (antes <i>Stegomastodon</i> sp.)	m3 izquierdo	MGJRG-3353/4	Colombia, Mosquera	Gómez (2006)
<i>N. platensis</i> (antes <i>Stegomastodon</i> sp.)	m3 izquierdo	DGM 121-M	Brasil, Minas Gerais.	Gadens (2008)
<i>N. platensis</i> (antes <i>Stegomastodon</i> sp.)	m3 izquierdo	MLP43-V-21-1	Argentina, Angel Etcheverri.	Gadens (2008)
<i>N. platensis</i> (antes <i>Stegomastodon</i> aff. <i>Stegomastodon platensis</i>)	m3 izquierdo	MHMOP/LB/13	Chile, Lomas Blancas.	Recabarren <i>et al.</i> (2014)
<i>N. platensis</i> (sinonimia <i>Haplomastodon chimborazi</i>)	m3 izquierdo	MECN 82	Ecuador, Bolivar.	Ferretti (2010)
<i>N. platensis</i> (sinonimia <i>Haplomastodon chimborazi</i>)	m3 izquierdo	MECN 82	Ecuador, Bolivar.	Ferretti (2010)
<i>Stegomastodon</i> sp.	m3 izquierdo	IGCU2634-GT02	México, Rancho El Ocote	Alberdi y Corona (2005)
<i>Stegomastodon</i> sp.	m3 izquierdo	NMMNHS P-27395	USA	Mothé <i>et al.</i> (2017)
<i>Stegomastodon</i> sp.	m3 izquierdo	AMNHDVP 25000	USA	Mothé <i>et al.</i> (2017)
<i>C. hyodon</i>	m3 izquierdo	s/n	Guatemala, Chahal	Lucas <i>et al.</i> (2016)
<i>C. hyodon</i>	m3 izquierdo	UF 129033	USA, Leisey Shell Pits	Lucas (2008a)
<i>C. hyodon</i>	m3 izquierdo	DMA5 694	USA, Daytona Beach	Lucas (2008a)
<i>C. hyodon</i>	m3 izquierdo	NMR 7783	Bolivia, Tarija	Campbell <i>et al.</i> (2009)
<i>C. tropicus</i>	m3 izquierdo	ISS AP6-120	El Salvador, Río Tomayate	Cisneros (2005)
<i>C. tropicus</i>	m3 izquierdo	2SS AP30-593	El Salvador, Río Tomayate	Cisneros (2005)

Tabla 4.4- Detalle de las fotografías de los molares usados para hacer los análisis de morfometría geométrica. En la tabla se muestra la especie en la que están clasificados, la sinonimia del taxón (si corresponde), el número de colección, el país y lugar en el que fueron hallados y las publicaciones de donde fueron obtenidas las fotografías.



Para el análisis de los m3 lado derecho y m3 lado izquierdo, se hicieron cuatro grupos formados por molares clasificados en: *Cuvieronius hyodon*, *Cuvieronius tropicus*, *Notiomastodon platensis* y *Stegomastodon* sp. En estos grupos se les dio un número correspondiente, el que fue usado en los programas que analizaron su dispersión y agrupamiento (Tabla 4.5).

Especie	Molar	Número de colección	Número en el programa
<i>Cuvieronius hyodon</i>	m3 derecho	s/n	1
		UF 9741	2
		DMAS 517	3
		DMAS 694	4
		UMPE 0608	5
		INAH-MRG s/n	6
		MPG 731	7
		INAH-MRG s/n	8
		INAH-MRG 10-295048	9
<i>Cuvieronius tropicus</i>	m3 derecho	1SSAP6-1	10
		2SSAP30-674	11
		2SSAP30-593	12
<i>Notiomastodon platensis</i>	m3 derecho	MHMOP/PI/15	13
		MPAB-217	14
		MOM 0001	15
		MAP 186	16
		MN 2602-V	17
		MECN 82	18
<i>Stegomastodon</i> sp.	m3 derecho	IGCU677-CTO2c	19
		IGCU408-CTO2c	20
<i>Cuvieronius hyodon</i>	m3 izquierdo	s/n	1
		UF 129033	2
		DMAS 694	3
		NMR 7783	4
<i>Cuvieronius tropicus</i>	m3 izquierdo	1SSAP6-120	5
		2SSAP30-593	6
<i>Notiomastodon platensis</i>	m3 izquierdo	MHMOP/PI/14	7
		MNHN-909	8
		MBR-s/n	9
		UACH.PV.CHO.01	10
		MGJRG-3353/4	11
		DGM 121-M	12
		MLP 43-V-21-1	13
		MECN 82	14
		MECN 82	15
<i>Stegomastodon</i> sp.	m3 izquierdo	MHMOP/LB/13	16
		IGCU2634-GT02	17
		NMMNHS P-27395	18
		AMNHDVP 25000	19

Tabla 4.5- Agrupación de molares, con su número de museo y el número asignado para el programa.



4.4.2- Técnica a emplear:

Mediante las coordenadas cartesianas, compuesto por los ejes de X e Y, fueron puestos 7 *landmarks* del tipo 2 y 10 *semi-landmarks*, a las fotografías de la zona oclusal de todos los m3 derecho e izquierdo de acuerdo a Bookstein (1991; 1997), Dryden y Mardia (1998) y Toro *et al.* (2010) (Fig. 4.8). Para marcar los puntos se usaron las siguientes directrices:

- I. Todas las fotografías fueron realizadas de manera que la zona anterior del molar queda orientada hacia arriba y la posterior hacia abajo.
- II. Los *semi-landmarks* (1 hasta el 10) se sitúan en la zona periférica de los molares.
- III. Los *semi-landmarks* fueron colocados en las zonas de los vértices del contorno de los lófidios, siguiendo la dirección que marcaban los mismos. Fueron distribuidos de la siguiente manera:

Semi-landmarks 1 y 6. En los extremos anterior y posterior de los molares, siguiendo el surco central del molar.

Semi-landmarks 2, 3, 4 y 5. Dispuestos en la zona pretrite del molar.

Semi-landmarks 7, 8, 9 y 10. Dispuestos en la zona postrite del molar.



- IV. Los *landmarks* del 11 al 17 se sitúan en la superficie oclusal de los molares. Dispuestos de la siguiente manera:

Hito 11. Entre el contacto de los mesocónidos del primer lófido.

Hito 12. Entre el contacto de los conúlidos posterior y anterior del primer y segundo lófido (pretrite).

Hito 13. Entre el contacto de los mesocónidos del segundo lófido.

Hito 14. Entre el contacto de los conúlidos posterior y anterior del segundo y tercer lófido (pretrite).

Hito 15. Entre el contacto de los mesocónidos del tercer lófido.

Hito 16. Entre el contacto de los conúlidos posterior y anterior del tercer y cuarto lófido (pretrite).

Hito 17. Entre el contacto de los mesocónidos del cuarto lófido

Cuando se observaba que entre alguna estructura no existía contacto, el *landmark* era puesto en el mesocónido de la zona pretrite en los *landmarks* 11, 13, 15 y 17 o en el conúlido posterior de la zona pretrite en los *landmarks* 12, 14 y 16.

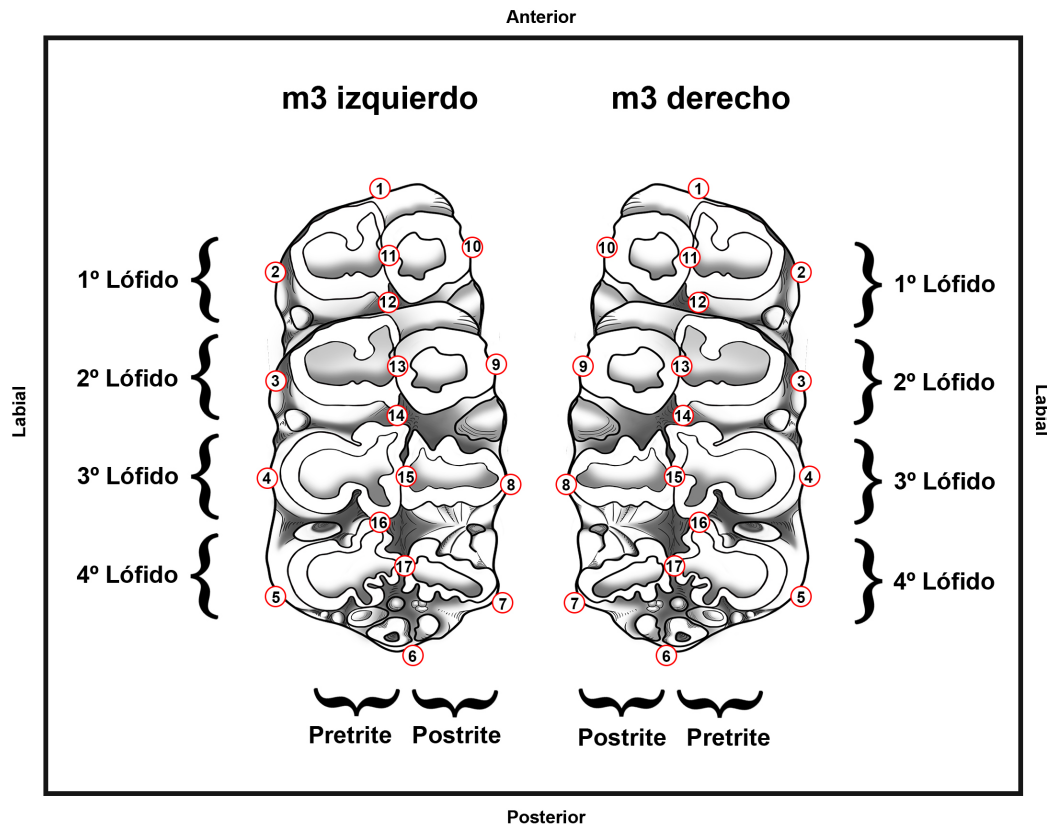


Figura 4.8- Esquema que representa los *landmarks* y *semi-landmarks* seleccionados para los análisis de morfometría geométrica.

Se usaron los programas del paquete estadístico gratuito TPS para análisis en 2D (Rohlf, 2015). Para el análisis de grupos se usó el programa gratuito MorphoJ (Klingenberg *et al.*, 2011) y para analizar el tamaño del centroide, el programa Past 3.24 (Hammer *et al.*, 2001).

El procedimiento para el análisis de la morfometría geométrica, fue el siguiente:



- I. Lo primero fue convertir todas las imágenes en formato JPG a formato TPS. Para esto se usó el programa tpsUtil versión 1.76. para Windows (Rohlf, 2018). Se escogió la opción *Build tps from images* y se cargaron todas las imágenes en JPG para convertirlas a formato TPS, en un solo archivo.

- II. Para colocar los puntos seleccionados, se aplicó el programa tpsDig2 versión 2.31 para Windows (Rohlf, 2017a). Seleccionamos el archivo TPS creado anteriormente. Se abrió la primera imagen y se midió la escala métrica para convertir las dimensiones en el programa, en milímetros. Luego se comenzaron a situar los *landmarks* ya consensuados (Fig. 4.8). Este procedimiento se aplicó en cada grupo de fotos que se utilizó, y al concluir se procedió a sobrescribir en el archivo TPS (guardado en la opción *Overwrite*). Esto se hizo con cada grupo de m3 derecho e izquierdo de los taxones utilizados.

- III. Posteriormente, con el programa tpsRelw versión 1.69 para Window (Rohlf, 2017b), se obtuvo la Superposición de Procrustes, para cada grupo de molares de cada taxón.

- IV. Antes de comenzar el análisis por grupos, se creó un archivo único con todos los archivos en TPS (de los cuatro taxones por cada molar analizado). En este archivo único, van agrupadas todas las



coordenadas de los cuatro taxones, de los m3 derecho y m3 izquierdo.

Esto se hizo con el programa tpsUtil.

- V. Se procedió a suavizar los *semi-landmarks*, para que el siguiente programa utilizado identifique que hay un grupo de *landmarks* situados describiendo una curva y que no son fijos, esto con el fin de evitar errores en el análisis.

- VI. El siguiente paso, antes de proceder al análisis por grupos, es verificar si los archivos TPS no han sufrido modificaciones, para esto se procedió a abrir los archivos con el programa TextEdit versión 1.13 para Apple. Se observaron en primera línea, la cantidad de *landmarks* (en cada individuo). En la segunda línea, se observaron las coordenadas de los *landmarks*. Finalmente, en la tercera línea el número de ID, que va desde 1 hasta el número de individuos que se hayan utilizado. Se cambiaron las comas por puntos en todas las cifras de las coordenadas y de esta manera evitar errores en la lectura de los datos.



- VII. Para el análisis de grupos, se utiliza el programa MorphoJ versión 1.06d para Windows. Aquí se realizaron las Alineaciones de Procrustes, los Análisis de Componentes Principales (ACP). Análisis de Varianzas Canónicas (ACV) y el Análisis de Función Discriminante (AFD).

5- EL ESTUDIO MOLECULAR DEL COLÁGENO (I) DE LOS GONFOTERIOS DE AMÉRICA



5.1- Introducción

Los logros de la evolución molecular se han sumado a la anatomía comparada y al registro fósil, como una tercera base para reconstruir la evolución de la vida en la tierra (Lowenstein y Scheuenstuhl, 1991).

En las investigaciones llevadas a cabo en el orden Proboscidea, se han aplicado muchos tipos de análisis para caracterizar sus taxones. Estos tipos de análisis, han usado: material inmunorreactivo, material inmunológico, patrones del prisma en los esmaltes y secuencias del ADN (e. g., *Mammut americanum*, *Mammuthus primigenius*, *Loxodonta cyclotis* y *Loxodonta africana* en Shoshani *et al.*, 1985; Cring, 1986; Lowenstein and Scheuenstuhl, 1991; Ozawa *et al.*, 1997; Barriel *et al.*, 1999; Schweitzer *et al.*, 2002; Debruyne, 2005; Rohland *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2008; Enk *et al.*, 2011; Gold *et al.*, 2014).

Shoshani *et al.* (1985) y Lowenstein y Scheuenstuhl, (1991), fueron los primeros en usar las proteínas para resolver cuestiones filogenéticas. Ellos utilizaron radioinmunoanálisis, para identificar las relaciones entre *Mammut americanum*, *Mammuthus primigenius*, *Elephas maximus* y *Loxodonta africana*.

Con las mejoras de la tecnología de espectrometría de masas, se ha logrado obtener más información y secuenciar cantidades (de péptidos fragmentados) de muestras subpicomolares (Asara *et al.*, 2007). El alcance de esta técnica queda demostrado en trabajos como Buckley *et al.* (2008), en ese estudio se obtuvo la secuencia de aminoácidos del *Mammut americanum*, la cual fue comparada con *Loxodonta africana*, *Elephas maximus*, *Mammuthus primigenius* y *Mammut americanum*, obteniendo un árbol filogenético.

Recientemente, en Buckley *et al.* (2019) se obtuvo una aproximación a la secuencia de aminoácidos del colágeno (I) de un gonfoterio (*Notiomastodon platensis*), con fósiles del yacimiento Pilauco del sur de Chile, proporcionando



una mejor resolución del árbol filogenético con las familias Elephantidae, Mammutidae y Gomphotheriidae. En este trabajo se obtuvieron señales únicas para mastodonte m/z 2032, gonfoterio m/z 2020 y mamut m/z 2018. Otras que solo se encontraban en gonfoterios - mastodontes m/z 3001, diferentes de mamut en m/z 2015 y otra en que los mastodontes difieren con gonfoterio – mamut m/z 3197.

5.2- Objetivo del estudio

- Obtener colágeno (I) del registro fósil de gonfoterios de América.
- Identificar diferencias y similitudes, entre los diferentes espectros positivos al colágeno (I) de los gonfoterios americanos.

5.3- Resultados

De las 70 muestras colectadas en toda América, solo se obtuvieron resultados positivos al colágeno en 13 muestras. Todas corresponden a Chile, tabla 5.1.

Al comparar los espectros de las muestras con resultados positivo de colágeno (I) y los picos en los espectros del trabajo de Buckley *et al.* (2019), donde se caracterizan los gonfoterios, mastodontes y mamuts, se obtuvo la tabla 5.2. El resultado de los espectros, se puede ver en la figura 5.1.



Especie	Fósil	Localidad	Número de Colección	País	¹⁴ C
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	Río Bueno	SGO-PV-44	Chile	11,090±70
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Tagua-Tagua	SGO-PV-47K	Chile	12,260±80
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Tagua-Tagua	SGO-PV-47C	Chile	--
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	San Pablo	SGO-PV-43	Chile	11,380±70
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Los Vilos	267A	Chile	--
Gonfoterio indet.	Costilla	Chillan	SGO-11	Chile	--
Gonfoterio indet.	Raíz de molar	Alto Boroa	MRAZ462	Chile	11875±50
<i>Cuvieronius</i> aff. <i>C. hyodon</i>	Raíz de molar	Monte Verde	A02147	Chile	--
Gonfoterio indet.	Costilla	Monte Verde	GEOUACH126	Chile	13,420±120
Gonfoterio indet.	Dentina de molar	La Plata	UACH.PV.LP.14	Chile	--
<i>Stegomastodon</i> aff. <i>S. platensis</i>	Raíz de molar	Choroico	UACH.PV.CHO.1	Chile	11,345±45
<i>Stegomastodon</i> aff. <i>S. platensis</i>	Dentina de molar	Lomas Blancas	MHMOP/LB/13	Chile	--
<i>Stegomastodon</i> aff. <i>S. platensis</i>	Raíz de molar	Chiloé-Castro	MMC 5	Chile	13,270±60

Tabla 5.1- Resultados positivos del análisis de colágeno (I). En la tabla se muestra la especie, elemento anatómico analizado (fósil), la zona del hallazgo, código institucional y las edades radiocarbónicas (sin calibrar) (tomadas de Gonzalez-Guarda *et al.*, 2017; 2018; Pino *et al.*, 2016; Cumsille, 2017) realizadas en el mismo material analizado en esta investigación.

País	Nº museo	G m/z 2020	Mas m/z 2032	Mam m/z 2018	G y Mas m/z 3001	Mam m/z 3015	G y Mam m/z 3197
Chi	SGO-PV44	X	--	--	X	--	--
Chi	267A	X	--	--	X	--	--
Chi	MHMOP/LB/13	X	--	--	X	--	--
Chi	SGO-11	X	--	--	X	--	--
Chi	GEOUACHP/LP/14	X	--	--	X	--	X
Chi	GEOUACH126	X	--	--	X	--	X
Chi	UACH.PV.CHO.01	X	--	--	X	--	X
Chi	A02147	X	--	--	X	--	X
Chi	MRAZ462	X	--	--	X	--	X
Chi	SGO-PV-47K	X	--	--	X	--	X
Chi	SGO-PV-47C	X	--	--	--	--	--
Chi	SGO-PV-43	X	--	--	X	--	X
Chi	MMC5	X	--	--	--	--	--

Tabla 5.2- Se muestran los resultados de los picos observados de cada espectro, coincidentes (con X) con: G m/z 2020, Mas m/z 2032, Mam m/z 2018, G and Mas m/z 3001, Mam m/z 3015, G and Mam m/z 3197, Buckley *et al.* (2019). Siglas: G= gonfoterio; Mas=mastodonte; Mam= mamut.

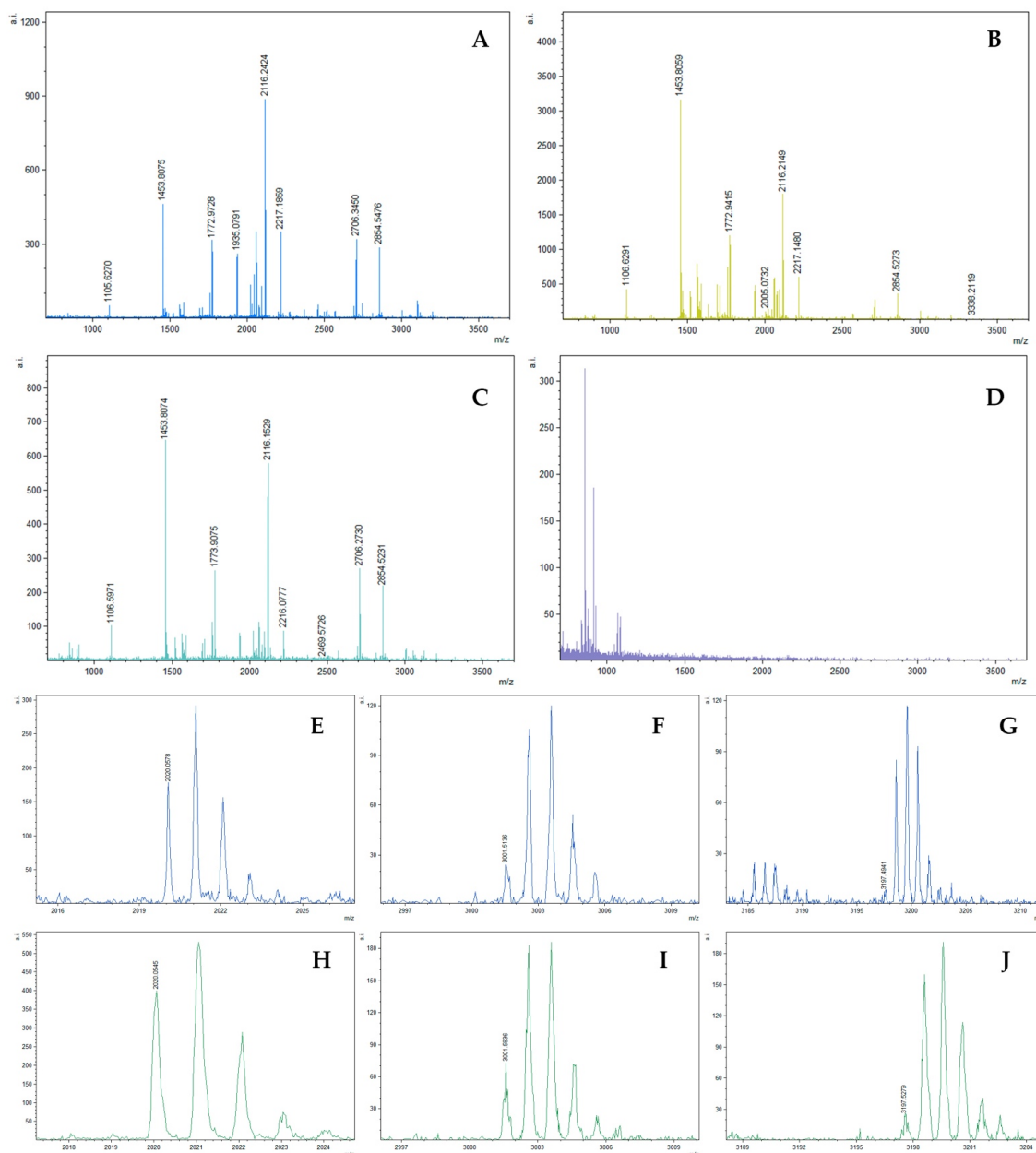


Figura 5.1- Espectros positivos del colágeno (I) en fósiles de gonfoterio de Chile. **A.** UACH.PV.CHO.01, **B.** SGO-11, **C.** SGO-PV-44 y una muestra negativa de colágeno (I), representada por **D.** P-46496, de Estados Unidos. **E.** GEOUACHP.LP.14 y **H.** A02147 mostrando m/z 2020 de gonfoterio. **F.** GEOUACHP.LP.14 y **I.** A02147 mostrando m/z 3001 de gonfoterio y mastodonte. **G.** GEOUACHP.LP.14 y **J.** A02147 mostrando m/z 3197 de gonfoterio y mamut. Todos los espectros se pueden ver en el anexo I.



5.4- Discusión

De acuerdo a los resultados de esta investigación, los procesos diagenéticos que transcurrieron en América no afectaron de igual forma a todos los elementos conservados (*sensu* Fernández-López, 1998), utilizados en esta investigación. Aunque es importante recalcar, que en las regiones tropicales/subtropicales, el colágeno se conserva relativamente bien (White y Schwarcz, 1989; White *et al.*, 1993). Los principales factores que operan en el deterioro de un fósil, si consideramos el hueso como un compuesto íntimo de proteínas y minerales son tres: deterioro químico de (1) la fracción orgánica (principalmente colágeno), (2) el mineral óseo, y (3) la biodegradación (Collins *et al.*, 2002). Es importante señalar que el hueso y la dentina son similares en tamaño, la composición y el contenido orgánico del cristal, serían igualmente vulnerables a los factores diagenéticos antes mencionados (Trueman *et al.*, 2004).

Collins *et al.* (1998) señalan que hay numerosos trabajos sobre la detección de proteínas en materiales arqueológicos, así como en fósiles. En ellos se indica que, si se excluye la biodegradación, la estructura macromolecular puede sobrevivir muchos milenios y los aminoácidos por millones de años. Sin embargo, las tasas generales y el destino de la descomposición proteínica en la geosfera, son poco conocidos.

Los procesos de fosilización son complejos y conllevan un número de variables difíciles de cuantificar, o muy complejos de medir. Sin embargo, se sabe que el agua forma un papel fundamental en la degradación de la materia orgánica e inorgánica de un hueso o elemento anatómico que fosilizará (Hedges y Millard, 1994). Estos mismos autores señala que el grado de cambio está determinado por la cantidad de agua presente, su movimiento y el movimiento de sus solutos. Muestran que tres tipos de interacción hidrológica (difusión, flujo



hidráulico y recarga) son importantes para los tres tipos de cambio diagenético (la absorción de uranio por el hueso, la disolución del hueso y la recristalización del hueso). Sin embargo, su importancia depende: del régimen hidráulico del sitio, del estado diagenético y, en consecuencia, de la distribución del tamaño de los poros del hueso, y de la química del cambio diagenético que se está considerando.

Los resultados de los análisis, denotan que las condiciones de fosilización en el Pleistoceno de Chile, hace que el material fósil tenga un alto grado de conservación del componente orgánico, transformando esta región en un reservorio natural de macromoléculas como el colágeno.

Previamente se sabía que algunas de las muestras contenían colágeno. Es el caso de MPG-PD-001 (dos muestras) tomada de la raíz de un molar y de la pelvis, proveniente de México. Con una edad radiocarbónica por AMS (*Accelerator Mass Spectrometry*) que lo situó en el Pleistoceno tardío. Catalogada y registrada entre dos posibles especies *Stegomastodon* cf. *S. primitivus* o *Stegomastodon rexroadensis* (Alberdi *et al.*, 2009). También la muestra GEOUACHP/TR/19 del sur de Chile, tomada de la raíz de un molar, cuya edad radiocarbónica es de 28.760 ± 390 B.P. (González *et al.*, 2017). Sin embargo, estas muestras dieron negativo al análisis del colágeno (I). Una posible causa del porqué no se encontró colágeno en algunas de las muestras de este estudio, sería la sensibilidad del análisis del AMS. En esencia, la técnica de ^{14}C por AMS, consiste en un sistema de espectrometría de masas en el que se intercala una fase de aceleración mediante un acelerador de partículas, unido a un proceso de cambio de carga que elimina los interferentes moleculares, y que por tanto permite alcanzar sensibilidades mucho mayores que en los sistemas de espectrometría de masas convencionales (Santos *et al.*, 2010). Este sistema no mide la actividad específica del ^{14}C , sino el recuento de los átomos mismos



(Hedges, 1983). Lo que hace este método mucho más sensible, incluso pudiendo medir el Carbono de aminoácidos individuales (*e.g.*, McCullagh *et al.*, 2010; Marom *et al.*, 2012). Sin embargo, Buckley (2018) destaca que es posible obtener huellas del colágeno, suficientemente buenas para la identificación de especies, a pesar de que el colágeno insoluble sea insuficiente para obtener resultados adecuados en radiocarbono o isótopos estables. Es posible que dentro de una misma muestra ocurran diferentes procesos tafonómicos, los cuales hacen que haya distintos tipos de conservación del colágeno en un mismo elemento. Al respecto Behrensmeyer (1978), señala que los huesos de los vertebrados terrestres se descomponen en las superficies subaéreas, y su destrucción puede considerarse parte del proceso normal de reciclaje de nutrientes en los suelos. El hecho de que un hueso sobreviva o no para convertirse en un fósil, depende de la intensidad y la velocidad de varios procesos destructivos y de la posibilidad de un entierro permanente antes de la destrucción total. Sorprendentemente se sabe muy poco acerca de cómo estos procesos afectan a los huesos y cómo pueden, por consiguiente, sesgar el registro fósil de los vertebrados. En algunos huesos el contenido orgánico se reduce en un 50% en 15 años. Como el colágeno (I) es el componente principal de la materia orgánica en el hueso, esta reducción en el contenido orgánico implica una hidrólisis significativa del colágeno (Trueman *et al.*, 2004). Además, Behrensmeyer (1978) menciona que las superficies expuestas de los huesos muestran los mayores cambios en el contenido de proteínas y la cristalinidad, lo que sugiere que la degradación del colágeno (y las consiguientes alteraciones en el mineral óseo) se deben a las fluctuaciones de temperatura y al efecto de la luz UV en la estructura del colágeno. Es imprescindible, al momento de tomar una muestra, hacer un examen visual y descartar cualquier problema de conservación en el fósil. De esta manera, asegurarnos el éxito en la obtención del colágeno.



En la revisión de los espectros positivos al colágeno (I), todas coincidieron con el pico representativo de gonfoterio (m/z 2020), dos no coincidieron con el pico que muestran gonfoterios y mastodontes (m/z 3001, MMC5 y SGO-PV-47C) y cinco no mostraron el pico presente en gonfoterios y mamuts (m/z 3197, SGO-PV44, 267, MHMOP/LB/13, MMC5 y SGO-PV-47C) (Tabla 5.2). Probablemente los fósiles que no obtuvieron esos picos, no conservaron esa sección de la cadena peptídica del colágeno. Ninguna de las muestras presentó picos distintos a los ya observados en Buckley *et al.* (2019), las cuales correspondían a fósiles provenientes del yacimiento Pilauco, en el sur de Chile. El resultado de esta tesis no puede asegurar la existencia de dos formas distintas de gonfoterio en el centro-sur de Chile, sugiriendo que solo existe la presencia de una sola forma de gonfoterio en esa zona.

**6- DIFERENCIACIÓN DE GRUPOS POR MEDIO DE
HISTOMORFOMETRÍA EN FÓSILES DE GONFOTERIOS
AMERICANOS**



6.1- Introducción

Se han desarrollado múltiples estudios de histología con los fósiles de proboscídeos, pero dichos estudios no se han aplicado para ordenar taxonómicamente un grupo dentro del orden Proboscidea. Trabajos con fósiles de *Elephas indicus*, *Mammuthus primigenius*, *Mammuthus columbi* y *Gomphotherium*, han estudiado la conservación del hueso compacto a través de su histología (Cook *et al.*, 1962). Otros como Schaedler *et al.* (1992), dieron a conocer la composición y estructura del colágeno (I) y restos de células, en tejidos mineralizados en fósiles de *Mammuthus columbi* de 11.200 años de antigüedad. A su vez, Ezra y Cook (1959) reportan el análisis histológico y químico que se realizó sobre los fósiles de hueso compacto de un mamut congelado de Alaska. El motivo fue ver las alteraciones tafonómicas producidas desde la muerte del animal. Se aplicaron técnicas de difracción de rayos X, petrografía y microscopia electrónica de barrido con espectroscopía de dispersión de rayos X, para observar las transformaciones (en su etapa diagenética) que sufrió un fósil del género *Cuvieronius* en México (Straulino *et al.*, 2019). Todos estos trabajos se han abocado principalmente a medir y describir las estructuras para determinar su grado de preservación, obviando las otras informaciones que potencialmente pueden proporcionar esos tejidos.

Este capítulo pretende aportar otra perspectiva desde la histología de los fósiles, al entendimiento de las relaciones taxonómicas de algunos miembros de la familia de los gonfoterios americanos.



6.2- Objetivo del estudio

- Conseguir una clara diferenciación por medio de las medidas y el análisis estadístico mediante el estudio de las estructuras microscópicas de los huesos fósiles de los gonfoterios *Cuvieronius hyodon*, *Stegomastodon platensis* y *Notiomastodon platensis*.

- Evaluar la utilización de distintas partes anatómicas de fósiles para discriminar taxones mediante su análisis histomorfométrico.

6.3- Resultados

Las medidas obtenidas se pueden ver en las tablas 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7:



SGO-11	s/n	GEOUACH 126	SGO-244C	70-1164	70-2099	G-24NC	MPG-PD- 001
108675,61	448771,21	233093,07	28027,05	114697,32	73121,42	75147,5	37348,1
37451,78	119028,14	12502,35	103366,09	57375,87	108730,4	33941,36	78933,84
57691,45	269472,91	30584,83	78123,39	202966,98	80072,03	27942,02	71820,43
33599,02	157132,27	42144,34	127151,05	83405,44	52217,6	30879,6	24823,93
61477,02	50876,18	82721,49	86302,35	241116,12	178392,49	46555,53	89990,07
38351,76	144565,03	99953,96	67112,89	219106,13	110795,75	30479,06	17897,29
59288,63	88898,84	70007,02	145969,29	93662,12	100279,41	37017,39	36819,61
71858,67	56021,11	82728,69	86651,12	143263,25	61637,92	50610,91	84935,92
56836,69	388011,26	63619,47	74758,74	207011,68	47203,53	56224,75	17441,07
67577,43	500142,67	24763,95	92561,42	100983,53	116040,42	120099,1	47269,7
90115,14	247058,89	226893,93	83351,51	204274,38	123741,77	144395,47	36071,89
41721,24	819927,55	28943,76	31452,04	126872,46	141625,02	53573,45	101870,09
120106,13	311707,09	58165,61	38490,12	100145,47	317596,39	33201,93	37575,09
39802,41	255087,31	162174,35	128136,05	77054,09	155094,71	72562,21	17198,59
82098,36	368268,76	46659,92	185923,09	135364,3	85205,56	28952,63	79393,56

Tabla 6.1- Medidas del área del osteón en μm^2 , obtenidas con el programa ImageJ y seleccionadas aleatoriamente con el programa Excel para tener grupos equivalentes. Los datos seleccionados fueron 15, de 8 láminas delgadas. De esta manera se integró el máximo de muestras al estudio.



SGO-11	s/n	GEOUACH 126	SGO-244C	70-1164	70-2099	G-24NC	MPG-PD- 001
1246,68	2526,24	1304,2	1176,42	1056,85	1001,16	898,75	1006,45
1151,05	1266,65	878,91	939,76	1007,34	1197,03	1285,01	1108,56
698,69	1433,04	1645,91	607,05	1150,75	1059,88	763,5	959,29
873,13	1517,92	977,54	1186,35	1679,44	836,82	702,38	1072,52
636,13	828,99	690,33	1330,07	1135,31	1577,95	860,29	1171,12
977,57	1454,23	927,63	1571,01	1105,2	1265,57	904,3	659,23
900,88	1097,39	1875,47	808,46	1398,02	1190,69	854,31	422,24
508,02	858,82	738,7	977,89	1645,66	901,68	509,26	814,83
906,84	2331,46	1068,67	1397,1	1174,85	785,11	1215,73	688,28
875,86	2742,82	647,33	1100,39	1683,69	1244,58	929,5	1109,18
731,1	1253,51	1289,87	1031,45	1237,27	1302,63	903,35	923,98
969,5	4344,83	761,44	1147,23	942,89	1362	1086,97	663,28
955,06	2061,76	1543,83	1098,43	1341,26	2046,16	1123,05	566,42
623,87	1876,08	1281,2	654,17	1800,88	1492,8	1771,75	843,23
1110,02	2324,62	631,21	746,8	1251,16	1092,15	835,06	589,8

Tabla 6.2- Medidas del perímetro del osteón en μm , obtenidas con el programa ImageJ y seleccionadas aleatoriamente con el programa Excel para tener grupos equivalentes. Los datos seleccionados fueron 15, de 8 láminas delgadas. De esta manera se integró el máximo de muestras al estudio.



SGO-11	s/n	GEOUACH 126	SGO-244C	70-1164	70-2099	G-24NC	MPG-PD- 001
255,75	349,03	255,69	320,11	277,89	286,1	98,29	203,93
229,88	531,73	303,79	311,48	223,28	345,07	218,1	336,94
253,96	396,27	230,19	385,42	304,47	284,88	197,2	213,67
202,89	226,24	235,24	320,74	331,79	220,6	278,29	182,93
255,58	355,46	405,28	253,43	353,24	423,5	232,84	290,16
315,03	277,88	213,12	415,96	334,37	323,58	499,79	319,67
202,17	236,25	210,75	293,73	521,92	318,78	196,33	271,55
244,34	617,94	217,42	269,24	454,15	270,55	215,76	257,3
267,88	622,39	273,91	285,52	312,5	221,25	274,19	381,06
266,58	459,16	273,57	278,46	304,58	339,38	131,03	276,66
204,92	923,15	191,23	174,24	334,22	378,39	365,26	194,84
231,6	560,87	483,54	191,88	367,2	396,4	275,12	315,12
255,75	491,95	206,68	372,46	182,67	552,13	120,73	165,68
209,45	523,62	305,99	459,03	520,77	372,76	229,7	156,11
197,75	399,04	391,44	220,9	316,41	273,84	296,59	517,34

Tabla 6.3- Medidas del diámetro del osteón en μm , obtenidas con el programa ImageJ y seleccionadas aleatoriamente con el programa Excel para tener grupos equivalentes. Los datos seleccionados por muestra fueron 15, de 8 láminas delgadas. De esta manera se integró el máximo de muestras al estudio.



SGO-11	s/n	GEOUACH 126	SGO- 244C	UACH.PV. TR.19	70-1169	70-1164	70-2099	G-24NC	MPG-PD -001
6154,91	27208,93	5320,24	4316,48	27473,76	8645,94	15882,65	1635,09	17998,22	3071,97
4147,42	23326,27	1794,66	2647,11	26780,23	23815,91	32273,75	7424,69	1195,28	4140,28
4817,76	268371,05	2846,9	5303,68	10948,23	9762,42	4894,62	2300,71	1153,9	3387,74
1454,2	19999,37	1767,5	3209,87	3844,77	38963,77	7048,73	14784,37	1353,7	1013,21
4286,92	17666,9	5722,22	5090,87	8864,72	39356,84	46968,31	2527,7	4364,96	21699,96
6268,42	10515,2	3720,62	10159,27	5546,28	6080,45	4686,19	1360,8	12837,59	2857,56
20543,18	6108,78	2916,29	913,9	7017,99	735,38	1663,41	2350,37	3277,13	3920,15
4790,58	89976,33	1821,94	2992,34	14176,69	8618,79	6613,65	36994,61	5436,24	5207,85
1710,75	3456,98	5339,24	1263,85	7883,95	8506,55	4429,42	3981,91	2965,14	7456,43
3585,84	22982,29	3609,49	9987,84	59009,73	9387,21	2455,59	671,53	1961,39	7739,83
6072,15	34430,28	984,84	5892,44	15311,67	65092,29	6626,65	2091,45	15283,95	7013,81
2932,04	5532,79	3040,81	3559,83	52895,09	10268,19	2307,01	3199,24	556,05	4901,89
3125,93	3644,96	2586,24	5536,58	21750,27	8596,41	10805,08	12381,97	2725,82	13054,71
5288,31	27884,99	1146,03	3216,97	23598,26	7827,85	4476,75	35088,78	1337,79	1412,82
10510,42	29493,09	10414,67	3417,95	4625,06	77132,89	5180,71	1579,52	2136,36	562,76
10219,57	21710,16	2078,21	4761,01	223897,6	5154,77	8389,23	1059,32	2328,7	2446,65
4340,12	3538,55	4071,76	1527,5	6748,29	2374,76	4545,38	6722,43	11010,91	27704,71
5648,9	25012,24	1864,45	760,2	10472,63	72054,58	7391,89	26270,16	6660,73	3379,63

Tabla 6.4- Medidas del área del canal de Havers en μm^2 , obtenidas con el programa ImageJ y seleccionadas aleatoriamente con el programa Excel para tener grupos equivalentes. Los datos seleccionados por muestra fueron 18, de 10 láminas delgadas. De esta manera se integró el máximo de muestras al estudio.



SGO-11	s/n	GEOUACH 126	SGO- 244C	UACH.PV. TR.19	70-1169	70-1164	70-2099	G-24NC	MPG-PD- 001
195,32	601,69	213,47	567,72	491,17	363,51	256,55	170,57	707,97	166,39
287,15	574,72	217,85	288,55	553,16	771,62	474,82	219,66	255,82	165,53
257,88	1686,59	116,92	262,96	738,34	370,4	130,67	284,6	189,57	174,85
243,28	978,93	774,44	364,35	254,16	736,88	190,3	515,57	90,03	647,44
304,23	569,36	252,78	340,2	410,33	795,41	474,81	233,21	494,05	303,73
540,52	663,54	187,54	201,11	621,3	287,59	157,76	171,74	198,75	163,75
376,4	356,74	322,19	190,67	371,47	101,12	255,67	157,13	185,11	205,21
285,76	557,05	270,08	244,74	476,12	354,77	279,15	330,84	270,42	193,7
250,18	1255,24	166	144,94	385,37	355,54	530,74	191,57	298,86	258,48
296,04	375,61	200,46	263,51	272,16	361,5	182,03	178,42	192,79	151,49
204,81	1984,37	222,07	257,09	377,16	1196,51	571,06	144,71	194,22	196,72
291,97	308,85	215,86	252,3	465,04	408,43	763,65	202,96	974,27	326,61
223,51	498,12	215,13	485,15	583,59	345,39	332,25	123,99	245,11	175,35
148,58	319,65	242,15	129,73	586,68	343	307,06	136,89	143,55	303,89
325,5	622,93	232,85	203,33	457,16	1150,61	232,74	207,28	143,42	245,53
289,54	581,47	364,69	216,24	473,98	294,75	263,71	249,15	148,96	398,96
285,72	155,3	249,05	221,9	691,04	196,22	293,92	177,96	247,51	339,79
332,51	357,52	240,17	112,44	231,19	1133,78	458,87	153,65	701,3	233,78

Tabla 6.5- Medidas del perímetro de los canales de Havers en μm , obtenidas con el programa ImageJ y seleccionadas aleatoriamente con el programa Excel para tener grupos equivalentes. Los datos seleccionados por muestra fueron 18, de 10 láminas delgadas. De esta manera se integró el máximo de muestras al estudio.



SGO-11	s/n	GEOUACH 126	SGO- 244C	UACH.PV. TR.19	70-1169	70-1164	70-2099	G-24NC	MPG-PD- 001
60,51	86,7	80,81	44,25	145,92	81,6	133,09	186	31,99	85,09
65,54	341,38	44,14	70,71	99,22	103,07	105,99	49,35	36,98	38,15
90,09	131,44	72,53	58,72	86,32	95,92	62,33	44,58	40,75	96,17
63,73	84,68	28,45	62,6	221,89	203,26	114,59	59,8	36,83	53,06
44,58	435,73	45,65	109,82	163,15	153,77	36,98	34,05	55,49	83,32
56,54	89,11	50,9	52,79	85,71	84,03	206,71	40,88	45,68	93,28
96,1	278,49	75,81	66,14	79,37	27,18	78,26	46,78	108,85	43,49
78,52	97,64	57,63	78,29	66,14	81,05	52,5	82,3	30,47	58,58
68,33	54,37	84,57	35,88	151,21	86,55	53,69	51,66	46,75	56,2
70,84	156,57	67,41	35,88	133,35	93,62	54,32	40,22	91,08	45,67
68,43	150,33	55,36	98,23	112,07	167,25	35,42	120,52	90,25	170,2
76,11	455,16	65,79	63,06	67,41	85,96	70,7	43,49	17,4	84,94
62,27	269,51	65,24	30,45	153,31	89,13	86,99	43,93	65,26	99,13
78,42	172,83	44,59	105,47	133,41	80,75	63,27	57,65	67,44	83,72
159,39	125,84	62,68	109,89	143,77	219,89	81,5	60,92	53,11	55,81
85,6	122,25	75,03	64,79	121,78	58,35	72,88	34,78	186,22	78,69
70,24	135,96	61,16	58,29	117,43	39,13	65,16	59,9	54	93,13
67,41	78,26	68,5	46,65	152,12	213,63	144,38	54,37	69,1	51,1

Tabla 6.6- Medidas del diámetro de los canales de Havers en μm , obtenidas con el programa ImageJ y seleccionadas aleatoriamente con el programa Excel para tener grupos equivalentes. Los datos seleccionados por muestra fueron 18, de 10 láminas delgadas. De esta manera se integró el máximo de muestras al estudio.



MUSA 1637	SGO-11	s/n	GEOUACH 126	SGO- 244C	UACH. PV.TR.19	70- 1169	70- 1164	70- 2099	G- 24NC	MPG-PD- 001
671,11	370,56	680,61	280,09	299,41	218,65	760,04	350,19	275,65	321,13	327,38
393,44	274,18	375,48	424,53	298,77	500,09	484,93	534,71	507,55	302,71	313,57
924,78	309,27	668,96	315,65	598,22	309,99	1051,12	392,68	463,35	407,51	367,19
763,61	416,74	872,71	356,09	295,38	662,21	505,38	418,49	152,79	369,25	216,2
601,57	533,29	404,6	178,87	319,84	248,77	649,36	1028,04	258,44	228,51	402,42
466,61	288,77	520,96	317,15	426,02	322,67	715,16	339,28	362,49	122,7	408,22
488,42	357,58	432,07	321,61	314,66	347,44	766,64	528,27	329,61	417,29	331,02
242,11	233,28	568,64	488,57	514,96	468,37	685,05	406,23	587,96	86,15	569,28
378,42	453,07	332,18	275,42	443,82	321,72	325,02	191,79	131,49	382,06	274,23
556,13	198,1	689,46	752,07	426,16	237,48	541,65	235,68	328,54	277,46	236,24
529,59	388,39	372,09	409,81	806,34	552,85	657,34	291,21	336,24	291,06	267,92
630,63	346,84	714,19	243,02	377,85	196,06	605,87	479,55	483,31	217,45	654,2
542,79	328,44	473,8	677,12	481,12	328,55	542,87	505,77	322,95	430,01	255,56
407,01	373,44	396,71	422,22	443,5	434	746,17	538,36	506,78	550,9	144,35
516,41	355,85	744,85	283,42	390,2	352,2	851,14	368,66	474,95	299,51	184,3
485,52	336,79	411,22	355,48	409,98	466,02	1020,9	322,01	388,44	322,43	360,87
444,65	523,65	886,63	392,39	343,52	523,64	264,21	587,96	193,97	526,34	400,14
520,5	243,26	346,87	243,78	346,97	608,7	443,64	380	579,69	258,39	136,44
354,85	328,49	347,09	408,53	366,01	807,2	543,54	488,26	238,33	355,45	333,79
702,44	316,9	284,66	401,77	249,28	531,88	524,69	395,51	429,6	193,07	212,62
578,15	358,18	306,69	371,02	353,82	496,21	474,69	450,88	117,88	133,31	244,14
200,11	377,74	532,13	332,99	223,37	414,1	274,02	254,22	555,28	187,39	412,03
352,55	526,08	554,96	410,14	226,18	462,05	280,15	389,5	398,36	325,46	344,4
247,4	239,46	427,32	259,89	303,99	291,59	294,39	535,69	401,22	352,55	409,55
731,63	215,55	522,5	507,72	620,92	654,3	858,09	477,37	186,75	303,76	104,35
536,91	326,26	459,29	544,63	387,2	488,92	454,12	677,34	409,05	291,29	430,08
613,78	300,53	370,21	446,4	592,29	305,9	1011,41	361,73	290,92	275,84	366,16
616,59	288,62	379,19	422,11	388,49	479,42	600,57	371,99	418,86	352,25	307,74
380,53	276,48	285,6	274,18	309,96	496,05	913,75	525,52	555,49	441,1	75,11
627,45	358,82	366,31	268,45	602,44	776,44	1104,26	526,48	307,13	395,7	174,95
601,64	437,02	562,32	238,15	332,31	449,85	387,13	384,25	427,07	274,27	476,08
595,37	331,39	1064,01	286,46	216,5	637,91	367,85	386,53	322,26	420,43	525,3
529,01	336,38	277,5	363,59	371,49	368,83	352,55	425,45	494,67	473,71	63,56
413,35	369,57	271,9	300,49	345,46	244,04	316,46	352,67	302,71	274,27	376,7
366,24	317,03	548,07	201,7	325,58	921,04	411,42	372,01	213,3	279,96	292,88
256,51	401,16	316,79	480,69	329,52	347,79	631,72	360,42	413,65	278,82	275,61
327,96	409,05	495	467,69	355,91	792,24	798,92	487,61	394,82	325,41	218,59
406,46	330,23	424,51	388,44	323,53	312,23	421,61	608,24	246,12	217,09	410,32
505,94	390,81	375,48	332,18	364,06	358,4	628,54	483,21	156,34	115,37	501,91
656,14	175,21	586,26	445,66	334,73	352,65	842,92	280,93	312,08	410,19	469,17
603,5	330,25	568,34	420,69	305,34	517,72	314,74	702,08	390,96	536,82	173,65
867,76	350,87	429,31	279,51	365,86	258,36	393,92	439,22	189,22	559,4	248,04
409,62	395,73	672,84	678,77	288,4	597,62	371,12	421,25	141,21	577,05	511,22
374,12	374,02	321,02	290,46	467,6	353,65	541,24	285,09	347,24	414,86	355,98

Tabla 6.7- Medidas de las distancias entre los canales de Havers en μm , obtenidas con el programa ImageJ y seleccionadas aleatoriamente con el programa Excel para tener grupos equivalentes. Los datos seleccionados por muestra fueron 44, de las 11 láminas delgadas. De esta manera se integró el máximo de muestras al estudio.



Las láminas delgadas que se escogieron por su calidad de conservación, mostraron gran cantidad de estructuras medibles. De todas las láminas, solo hubo una excepción, la muestra UACH.PV.TR.19 en el momento de medir el osteón: corresponde a una muestra de mandíbula, donde no fue posible determinar los límites de las osteonas debido a que la conservación de esas estructuras. Sin embargo, sí fue posible realizar mediciones en sus canales de Havers. La misma muestra UACH.PV.TR.19, no se incluyó en los gráficos de promedio para no interferir con las comparaciones. Todos los demás promedios de las medidas por estructura, se pueden ver en la tabla 6.8 y figuras 6.1 y 6.2 (ver en Anexo III todas las medidas). Las fotografías de algunas secciones de las láminas delgadas para cada muestra, se pueden ver en las figuras 6.3 y 6.4.



Osteón						
País	Código	Especie	Área μm^2	Perímetro μm	Diámetro μm	
Chile	MUSA 1637	Gonfoterio indet.	36142,04	716,22	169,62	
Chile	SGO-11	Gonfoterio indet.	63567,94	899,2	243,69	
Chile	s/n	Gonfoterio indet.	264358,71	1863,83	465,33	
Chile	GEOUACH126	Gonfoterio indet.	89010,47	1062,03	287,37	
Chile	SGO-244C	Gonfoterio indet.	87339,3	1069,45	296,52	
El Salvador	70-1169	<i>C. hyodon</i>	144665,62	1430,33	353,01	
El Salvador	70-1164	<i>C. hyodon</i>	128939,97	1285,64	353,92	
El Salvador	70-2099	<i>C. hyodon</i>	116783,62	1223,74	333,81	
Costa Rica	G-24NC CFM-139	<i>C. hyodon</i>	71421	950,83	258,37	
México	MPG-PD-001	<i>S. platensis</i>	59335,67	868,52	241,61	
Canal de Havers						
País	Código	Especie	Área μm^2	Perímetro μm	Diámetro μm	Distancia μm
Chile	MUSA 1637	Gonfoterio indet.	27509,07	605,03	125,3	516,93
Chile	SGO-11	Gonfoterio indet.	6369,25	287,25	74,65	328,54
Chile	s/n	Gonfoterio indet.	48323,14	676,01	170,01	510,62
Chile	GEOUACH126	Gonfoterio indet.	6194,95	261,21	69,64	407,58
Chile	SGO-244C	Gonfoterio indet.	4569,72	232,59	63,11	382,57
Chile	UACH.PV.TR.19	<i>N. platensis</i>	25677,04	539,88	128,49	471,79
El Salvador	70-1169	<i>C. hyodon</i>	22354,16	531,5	109,11	584,77
El Salvador	70-1164	<i>C. hyodon</i>	11032,7	361,78	93,06	428,19
El Salvador	70-2099	<i>C. hyodon</i>	6284,58	259,1	67,14	356,33
Costa Rica	G-24NC	<i>C. hyodon</i>	6987,4	251,4	69,37	329,82
México	MPG-PD-001	<i>S. platensis</i>	5580,45	247,89	66,83	291,09

Tabla 6.8- Promedio de todas las medidas que se hicieron en las osteonas y canal de Havers.

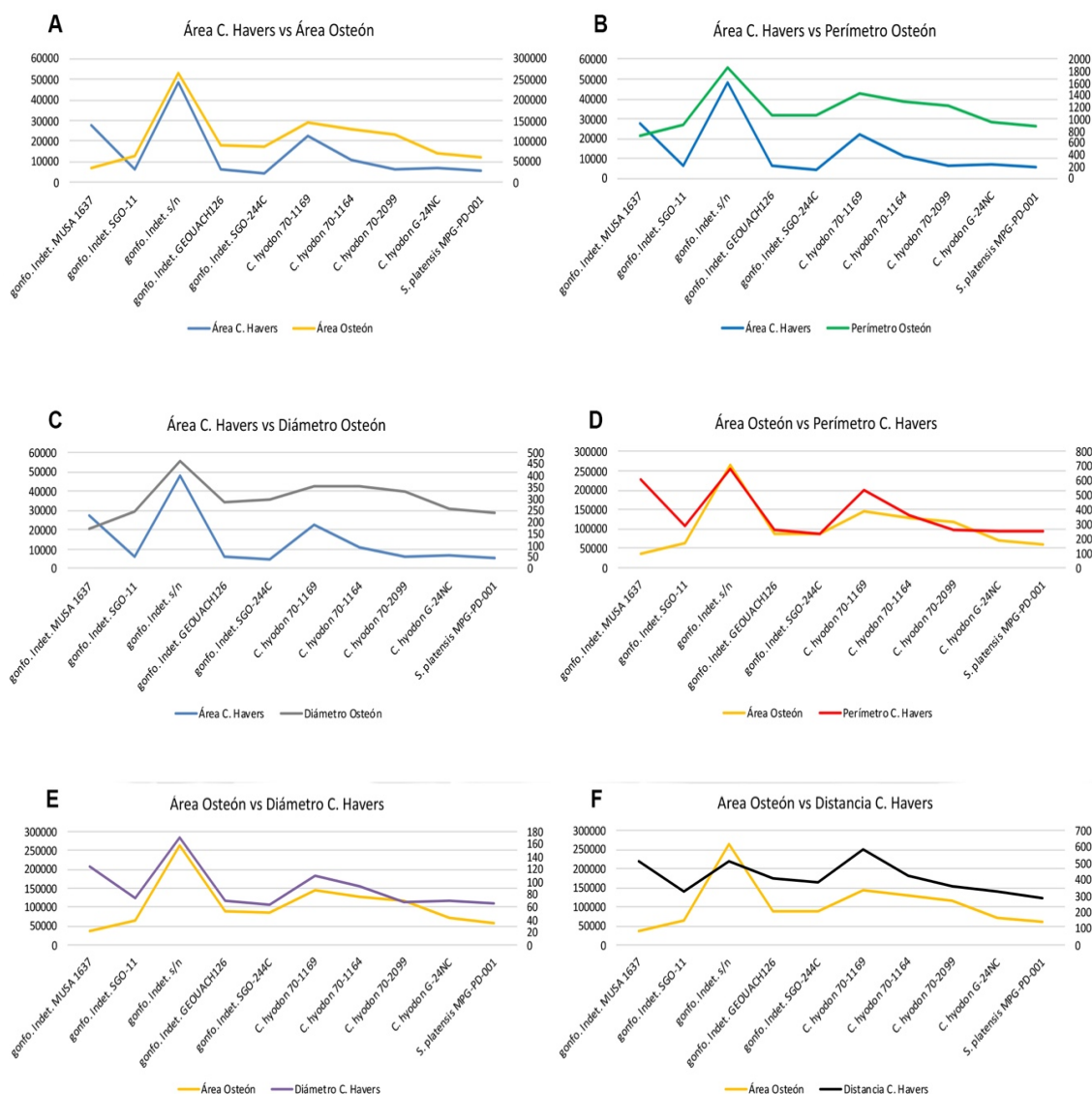


Figura 6.1- Gráficos de contrastes entre todos los promedios. De **A** a **C**, Área del Canal de Havers *versus* Área del Osteón, Perímetro del Osteón y Diámetro del Osteón. De **D** a **F**, Área del Osteón *versus* Perímetro del Canal de Havers, Diámetro del Canal de Havers y Distancia de los Canales de Havers.

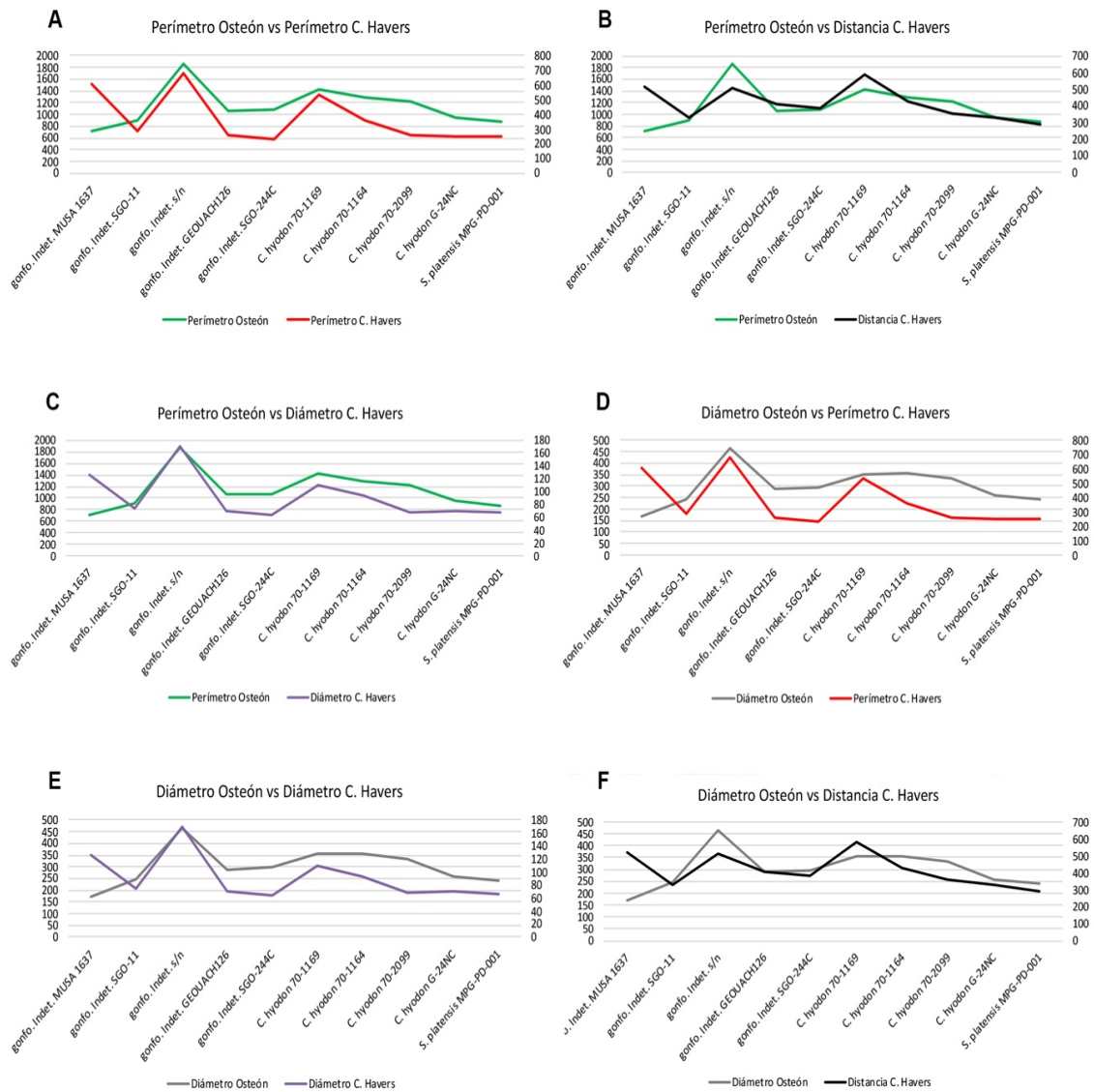


Figura 6.2- Gráficos de contrastes entre todos los promedios. De **A** a **C**, Perímetro del Osteón *versus* Perímetro del Canal de Havers, Distancia de los Canales de Havers y Diámetro del Canal de Havers. De **D** a **F**, Diámetro del Osteón *versus* Perímetro del Canal de Havers, Diámetro del Canal de Havers y Distancia de los Canales de Havers.

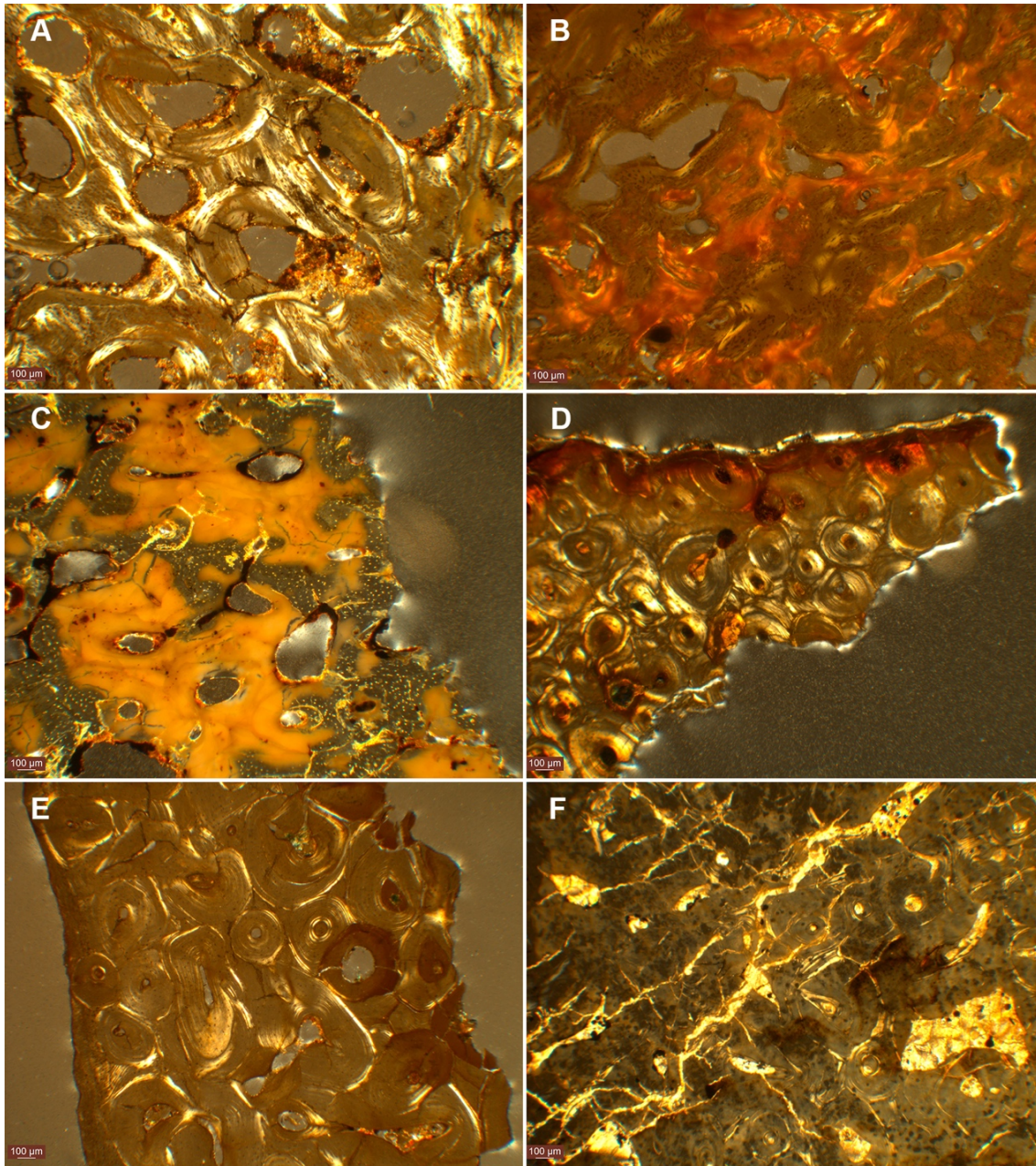


Figura 6.3- Imágenes de las láminas delgadas de los materiales de Chile, usadas en el estudio. **A.** s/n (cráneo), **B.** UACH.PV.TR.19 (mandíbula), **C.** MUSA 1637 (mandíbula), **D.** SGO-11 (costilla), **E.** GEOUACH126 (costilla) y **F.** SGO-244C (costilla). Las fotografías ensambladas, se pueden ver en el anexo II.

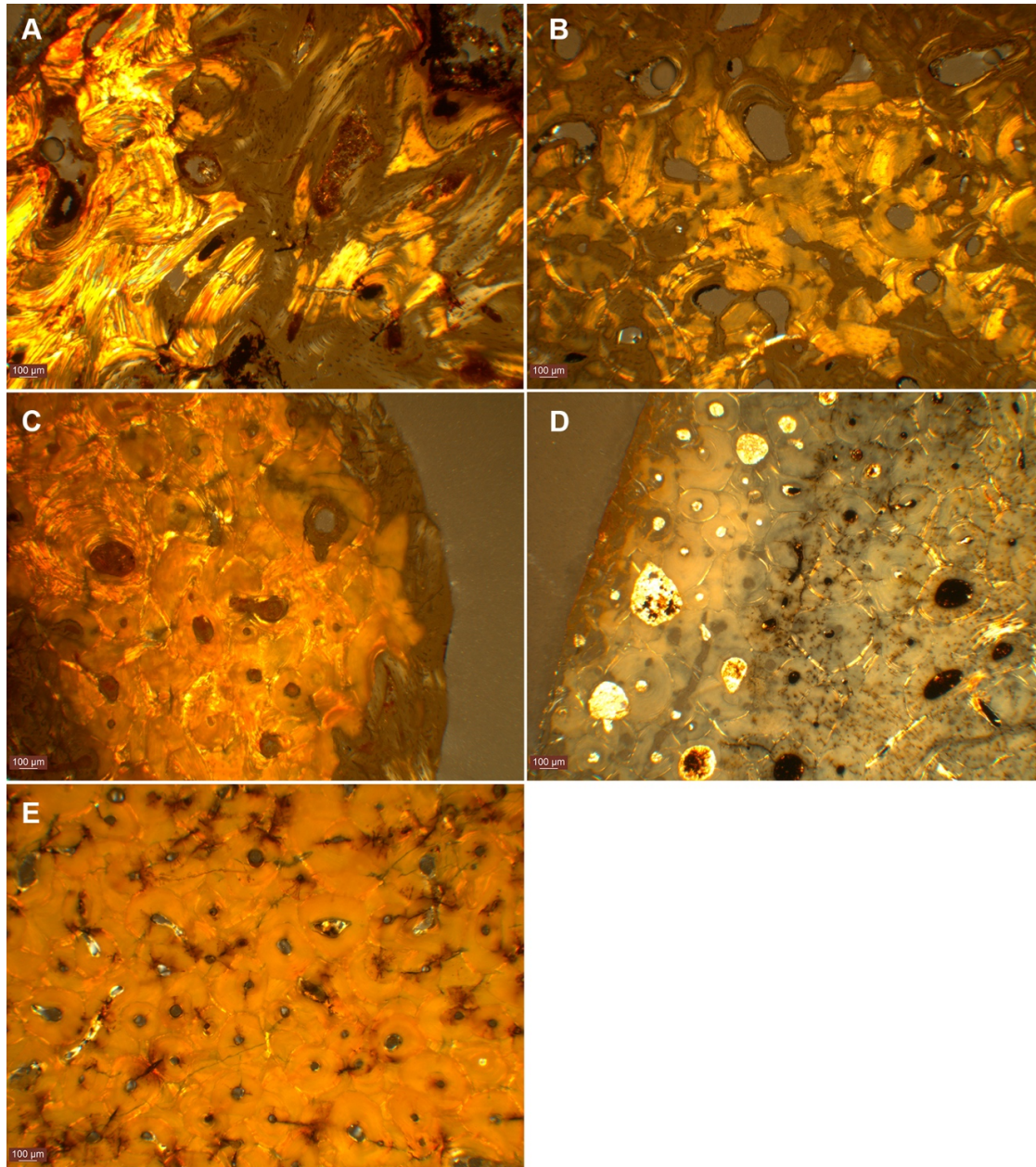


Figura 6.4- Imágenes de las láminas delgadas de El Salvador (de A a C), Costa Rica (D) y México (E), usadas en el estudio. A. 70-1169 (mandíbula), B. 70-1164 (mandíbula), C. 70-2099 (mandíbula), D. G-24NC CFM-1390 (costilla) y E. MPG-PD-001 (coxal). Las fotografías ensambladas, se pueden ver en el anexo II.



Se compararon los promedios de todas las medidas (Fig. 6.1 y 6.2), para ver cómo se comportaban en un gráfico con dos ejes. De esta manera aumentan las diferencias o similitudes, y se hacen más evidentes las fluctuaciones. Al observar los promedios, vemos que la muestra MUSA 1637 de Chile, es quien tiene las diferencias más notables en los gráficos Área C. Havers vs Área Osteón, Área C. Havers vs Perímetro Osteón, Área C. Havers vs Diámetro Osteón, Perímetro Osteón vs Perímetro C. Havers, Perímetro Osteón vs Diámetro C. Havers, Diámetro Osteón vs Perímetro C. Havers y Diámetro Osteón vs Diámetro C. Havers (Fig. 6.1 A, B, C; Fig. 6.2 A, B, D, E). Al hacer una revisión general de los gráficos de comparación de promedios, vemos que las mayores diferencias, en distancia de valores, las vemos en las muestras de costilla de gonfoterio indeterminados (GEOUACH126 y SGO-244C), así como en las muestras de mandíbula de *Cuvieronius hyodon* (70-1164 y 70-2099). Estas diferencias, son muy evidentes en los gráficos de Área C. Havers vs Perímetro Osteón y Área C. Havers vs Diámetro Osteón (Fig. 6.1 B y C). La muestra que presenta las diferencias menos perceptibles, corresponde a la de gonfoterio indeterminado s/n (muestra de cráneo). Es evidente en los gráficos de Área C. Havers vs Área Osteón y Área Osteón vs Diámetro C. Havers (Fig. 6.1 A y E). Esta misma muestra, presenta un comportamiento distinto a las demás en los gráficos de Área Osteón vs Distancia C. Havers, Perímetro Osteón vs Diámetro C. Havers y Diámetro Osteón vs Diámetro C. Havers (Fig. 6.1 F; Fig. 6.2 C, E). También está presente un comportamiento distinto al resto de los promedios, en la muestra de mandíbula de *Cuvieronius hyodon* (70-2099). Esto es evidente en el gráfico Área Osteón vs Diámetro C. Havers (Fig. 6.1 E).



6.3.1- *Análisis de la varianza de las medias:*

Se realizaron ANOVA de una sola vía, con el fin de analizar la varianza de los datos. También se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis, cuando no se encontraron distribuciones normales en los datos. Los resultados de esos análisis, son los siguientes:

6.3.1.1- *Área del osteón*

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, señaló que se cumple el supuesto de normalidad (estadístico entre 0,778 y 0,972; gl: 15; $P > 0,05$), en al menos cinco de las ocho muestras. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, señala que no se cumple el supuesto (estadístico entre 7,727 y 9,302; gl1: 7; gl2: 112; $P < 0,05$). La prueba de rachas para determinar independencia y aleatoriedad de los datos, señala que se cumple el supuesto ($P > 0,05$).

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias en el área del osteón entre los grupos comparados ($F: 11,458$; $P < 0,05$). La prueba Post-Hoc de Games-Howell dio como resultado que existen diferencias en algunos grupos, la que se muestra en la tabla 6.9.



Muestras comparadas		Diferencia de medias	Error estándar	P-valor
SGO-11	s/n	-217221,19200	53405,66999	0,018
SGO-11	70--1164	-76043,18667	16743,5998	0,004
s/n	GEOUACH126	197334,16533	55941,55765	0,041
s/n	SGO-244C	191172,86800	54137,36454	0,046
s/n	G-24NC	225559,08733	53723,12816	0,014
s/n	MPG-PD-001	229705,33600	53512,85511	0,012
70--1164	G-24NC	84381,08200	17730,11694	0,002
70-1164	MPG-PD-001	88527,33067	17082,39472	0,001
70-2099	MPG-PD-001	64824,34933	18904,62461	0,046

Tabla 6.9- Muestras que presentaron diferencias significativas en la prueba Post-Hoc de Games-Howell, para el área del osteón ($P < 0,05$).

6.3.1.2- Perímetro del osteón

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, señaló que se cumple el supuesto de normalidad (estadístico entre 0,880 y 0,978; gl: 15; $p > 0,05$), en al menos siete de las ocho muestras. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, señala que no se cumple el supuesto (estadístico entre 4,493 y 8,382; gl1: 7; gl2: 112; $p < 0,05$). La prueba de rachas para determinar independencia y aleatoriedad de los datos, señala que se cumple el supuesto ($p > 0,05$).

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias en el área del osteón entre los grupos comparados ($F: 9,023$; $p < 0,05$). La prueba Post-Hoc de Games-Howell dio como resultado que hay diferencias en algunos grupos, la que se muestra en la tabla 6.10.



Muestras comparadas		Diferencia de medias	Error estándar	P-valor
SGO-11	s/n	-983,59733	242,12464	0,017
SGO-11	70--1164	-429,74467	88,83634	0,001
SGO-11	70-2099	-346,12067	98,72319	0,033
s/n	G-24NC	885,01000	248,15591	0,039
s/n	MPG-PD-001	1021,33000	243,62645	0,013
70-1164	MPG-PD-001	467,47733	92,85149	0,001
70-2099	MPG-PD-001	383,85333	102,35123	0,018

Tabla 6.10- Muestras que presentaron diferencias significativas en la prueba Post-Hoc de Games-Howell, para el perímetro del osteón ($P < 0,05$).

6.3.1.3- Diámetro del osteón

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, señaló que se cumple el supuesto de normalidad (estadístico entre 0,855 y 0,977; gl: 15; $p > 0,05$), en al menos siete de las ocho muestras. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, señala que no se cumple el supuesto (estadístico entre 3,042 y 6,357; gl1: 7; gl2: 112; $p < 0,05$). La prueba de rachas para determinar independencia y aleatoriedad de los datos, señala que se cumple el supuesto ($p > 0,05$).

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencias en el área del osteón entre los grupos comparados ($F: 7,781$; $p < 0,05$). La prueba Post-Hoc de Games-Howell dio como resultado que hay diferencias significativas en algunos grupos, la que se muestra en la tabla 6.11.



Muestras comparadas		Diferencia de medias	Error estándar	P-valor
SGO-11	s/n	-225,16333	47,29673	0,005
SGO-11	70-1164	-103,06200	25,89389	0,017
SGO-11	70-2099	-94,24533	23,53988	0,015
s/n	GEOUACH126	184,87600	51,50824	0,032
s/n	G-24NC	222,78400	53,27881	0,008
s/n	MPG-PD-001	192,53467	52,6639	0,026
GEOUACH126	s/n	-184,87600	51,50824	0,032

Tabla 6.11- Muestras que presentaron diferencias significativas en la prueba Post-Hoc de Games-Howell, para el diámetro del osteón ($P < 0,05$).

6.3.1.4- Área del canal de Havers

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, señaló que no se cumple el supuesto de normalidad (estadístico entre 0,487 y 0,784; gl: 18; $P < 0,05$). La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, señala que no se cumple el supuesto (estadístico entre 2,156 y 4,653; gl1: 9; gl2: 170; $P < 0,05$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Esta prueba determinó que hay diferencias en el área de los canales de Havers, entre los grupos que se compararon ($P < 0,05$). Mediante la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, dio como resultado diferencias en algunos grupos, las que se muestran en la tabla 6.12.



Muestras comparadas		Estadístico	Error estándar	P-valor
GEOUACH126	70-1169	-72,722	-4,187	0,001
GEOUACH126	UACH.PV.TR.19	-82,444	-4,747	0,000
GEOUACH126	s/n	83,778	4,824	0,000
G-24NC	70-1169	61,667	3,55	0,017
G-24NC	UACH.PV.TR.19	71,389	4,11	0,002
G-24NC	s/n	72,722	4,187	0,001
SGO-244C	70-1169	-61,389	-3,534	0,018
SGO-244C	UACH.PV.TR.19	-71,111	-4,094	0,002
SGO-244C	s/n	72,444	4,171	0,001
70-2099	UACH.PV.TR.19	60,833	3,502	0,021
70-2099	s/n	62,167	3,579	0,016
MPG-PD-001	UACH.PV.TR.19	57,833	3,33	0,039
MPG-PD-001	s/n	59,167	3,407	0,03

Tabla 6.12- Muestras que presentaron diferencias significativas en la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, para el área del canal de Havers ($P < 0,05$). Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni.

6.3.1.5- Perímetro del canal de Havers

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, señala que no se cumple el supuesto de normalidad (estadístico entre 0,611 y 0,884; gl: 18; $p < 0,05$). La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, señala que no se cumple el supuesto (estadístico entre 3,539 y 8,535; gl1: 9; gl2: 170; $p < 0,05$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Esta prueba determinó que hay diferencias en el perímetro de los canales de Havers, entre los grupos que se compararon ($p < 0,05$). Mediante la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, dio como resultado diferencias significativas en algunos grupos, las que se muestran en la tabla 6.13.



Muestras comparadas		Estadístico	Error estándar	P-valor
70-2099	70-1169	78,833	4,539	0,000
70-2099	UACH.PV.TR.19	87,222	5,022	0,000
70-2099	s/n	95,611	5,505	0,000
GEOUACH126	70-1169	-58,444	-3,365	0,034
GEOUACH126	UACH.PV.TR.19	-66,833	-3,848	0,005
GEOUACH126	s/n	75,222	4,331	0,001
MPG-PD-001	70-1169	58,389	3,362	0,035
MPG-PD-001	UACH.PV.TR.19	66,778	3,845	0,005
MPG-PD-001	s/n	75,167	4,328	0,001
G-24NC	UACH.PV.TR.19	62,944	3,624	0,013
G-24NC	s/n	71,333	4,107	0,002
SGO-244C	UACH.PV.TR.19	-62,444	-3,595	0,015
SGO-244C	s/n	70,833	4,078	0,002

Tabla 6.13- Muestras que presentaron diferencias significativas en la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, para el perímetro del canal de Havers ($P < 0,05$). Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni.

6.3.1.6- Diámetro del canal de Havers

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, señala que no se cumple el supuesto de normalidad (estadístico entre 0,651 y 0,971; gl: 18; $p < 0,05$). La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, señala que no se cumple el supuesto (estadístico entre 4,747 y 10,786; gl1: 9; gl2: 170; $p < 0,05$).

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Esta prueba determinó que hay diferencias en el diámetro de los canales de Havers, entre los grupos que se compararon ($p < 0,05$). Mediante la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, dio como resultado diferencias significativas en algunos grupos, las que se muestran en la tabla 6.14.



Muestras comparadas		Estadístico	Error estándar	P-valor
70-2099	70-1169	65,25	3,757	0.008
70-2099	UACH.PV.TR.19	87,611	5,044	0,000
70-2099	s/n	93,694	5,395	0,000
G-24NC	70-1169	58,139	3,347	0,037
G-24NC	UACH.PV.TR.19	80,5	4,635	0,000
G-24NC	s/n	86,583	4,985	0,000
GEOUACH126	UACH.PV.TR.19	-75,361	-4,339	0,001
GEOUACH126	s/n	81,444	4,689	0,000
SGO-244C	UACH.PV.TR.19	-69,444	-3,998	0,003
SGO-244C	s/n	75,528	4,349	0,001
MPG-PD-001	s/n	59,972	3,453	0,025
SGO-11	s/n	-56,75	-3,267	0,049

Tabla 6.14- Muestras que presentaron diferencias significativas en la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, para el diámetro del canal de Havers ($P < 0,05$). Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni.

6.3.1.7- Distancia entre los canales de Havers

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, señala que no se cumple el supuesto de normalidad (estadístico entre 0,977 y 0,184; gl: 44; $p < 0,05$), a lo menos en siete de las once muestras. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene, señala que se cumple el supuesto (estadístico entre 1,069 y 2,839; gl1: 10; gl2: 473; $p > 0,05$). La prueba de rachas para determinar independencia y aleatoriedad de los datos, señala que se cumple el supuesto ($p > 0,05$).

Pese a la robustez de la prueba de ANOVA que permite analizar muestras, a pesar de no presentar una distribución normal mayoritaria, se prefirió optar por una prueba no paramétrica como la de Kruskal-Wallis. Esta prueba determinó que hay diferencias en la distancia de los canales de Havers, entre los



grupos que se compararon ($p < 0,05$). Mediante la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, dio como resultado diferencias significativas en algunos grupos, las cuales se muestran en la tabla 6.15.

Muestras comparadas		Estadístico	Error estándar	P-valor
SGO-11	70-1169	-165,227	-5,541	0,000
GEOUACH126	70-1169	-138,034	-4,629	0,000
SGO-244C	70-1169	-131,841	-4,421	0,001
SGO-11	s/n	-122,557	-4,11	0,002
MPG-PD-001	70--1164	99,17	3,326	0,048
G-24NC	70--1164	104,591	3,508	0,025
70-2099	s/n	111,102	3,726	0,011
SGO-244C	MUSA1637	114,045	3,825	0,007
GEOUACH126	MUSA1637	120,239	4,032	0,003
MPG-PD-001	s/n	128,307	4,303	0,001
G-24NC	s/n	133,727	4,485	0,000
70-2099	MUSA1637	135,977	4,56	0,000
SGO-11	MUSA1637	147,432	4,944	0,000
MPG-PD-001	MUSA1637	153,182	5,137	0,000
70-2099	70-1169	153,773	5,157	0,000
G-24NC	MUSA1637	158,602	5,319	0,000
MPG-PD-001	70-1169	170,977	5,734	0,000
G-24NC	70-1169	176,398	5,916	0,000

Tabla 6.15- Muestras que presentaron diferencias significativas en la prueba Post-Hoc de U de Mann-Whitney, para la distancia entre los canales de Havers ($P < 0,05$). Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni.



6.4- Discusión

Uno de los objetivos de este trabajo, se centró principalmente en, por medio de las estructuras microscópicas del hueso, ayudar a resolver el problema de la clasificación de los gonfoterios en América. Para este cometido, se utilizaron los fósiles de tres especies de la familia Gomphotheriidae en América. Sin embargo, los resultados, no son completamente concluyentes. Si observamos la tabla con el promedio de las medidas (Tabla 6.8), tenemos para el área del osteón los fósiles de mandíbula que presentan el mayor promedio de las medidas, corresponden a: 70-1169 ($144.665,62 \mu\text{m}^2$), 70-1164 ($128.939,97 \mu\text{m}^2$) y 70-2099 ($116.783,62 \mu\text{m}^2$) respectivamente. Todos son fósiles de *C. hyodon* de El Salvador. Seguidos al final por el promedio de MUSA 1637 ($36.142,04 \mu\text{m}^2$), una muestra de fósil de mandíbula de gonfoterio indeterminado, proveniente de Chile. Lo mismo se observa con el promedio del perímetro y del diámetro. *C. hyodon* presenta las mayores dimensiones para el área, perímetro y diámetro del osteón. Cuando observamos el promedio del área del canal de Havers, el orden cambia y MUSA 1637 ($27.509,07 \mu\text{m}^2$) se pone delante con el promedio más alto, seguido por UACH.PV.TR.19 ($25.677,04 \mu\text{m}^2$), un fósil clasificado como *N. platensis* de Chile. Al final, en el mismo orden que en el área del osteón, se presentan los fósiles de El Salvador: 70-1169 ($22.354,16 \mu\text{m}^2$), 70-1164 ($11.032,7 \mu\text{m}^2$) y 70-2099 ($6.284,58 \mu\text{m}^2$). Cuando analizamos el perímetro, se observa que las mayores dimensiones las posee MUSA 1636 ($605,03 \mu\text{m}$), no así en el diámetro ($125,3 \mu\text{m}$), ni en la distancia entre los canales de Havers ($516,93 \mu\text{m}$). Cuando observamos las medidas de las dimensiones del osteón en las costillas, vemos que las mayores dimensiones para el área del osteón, las tiene la muestra GEOUACH126



(89.010,47 μm^2), para el perímetro del osteón la muestra SGO-244C (1.069,45 μm) y para el diámetro del osteón, la muestra SGO-244C (296,52 μm), todas muestras de costilla de Chile. Dejando relegada en el promedio menor a la muestra de Costa Rica G-24NC (salvo en el perímetro y el diámetro del osteón). Cuando observamos las medidas del canal de Havers en las costillas, las mayores dimensiones están con las muestras de Chile (SGO-11 con 287,25 μm , en el perímetro y 74,65 μm , en el diámetro), con excepción del área de los canales de Havers, donde la muestra de costilla de Costa Rica (G-24NC) está en primer lugar, con 6.987,4 μm^2 . Por lo tanto, las probabilidades de que las medidas con mayor potencial taxonómico para Gomphotheriidae estén en el osteón, son bastante altas. Sin embargo, el número de comparaciones para las mediciones de las osteonas (tres muestras de mandíbula y una de costilla para *C. hyodon* frente a una muestra de mandíbula y tres de costilla de gonfoterio indeterminado), pueden generar tergiversaciones de los resultados.

Si analizamos los resultados de las ANOVA y pruebas de Kruskal-Wallis, en las osteonas y canales de Havers, es perceptible que, al comparar elementos esqueléticos distintos, éstos presenten diferencias significativas. Cuando se hace la comparación entre elementos esqueléticos iguales, destaca en el diámetro del canal de Havers (Tabla 6.14), diferencias en 70-2099 (muestra de mandíbula de *C. hyodon*) y las muestras UACH.PV.TR.19 (fragmento de mandíbula de *N. platensis*) y 70-1169 (fragmento de mandíbula de *C. hyodon*). También hay diferencias significativas en la distancia del canal de Havers (Tabla 6.15), en 70-2099 (muestra de mandíbula de *C. hyodon*) y las muestras MUSA 1637 (muestra de mandíbula de gonfoterio indeterminado) y 701169 (muestra de mandíbula de *C. hyodon*). Sin embargo, esto no resulta del todo significativo, ya que son muy pocas muestras asociadas a la diferencia, e incluso, una de ellas corresponde a la misma especie



(*C. hyodon*). Dentro de todas las posibles explicaciones, cabe destacar que, incluso, no es descartable una clasificación errónea del elemento anatómico asociado a *C. hyodon* de El Salvador.

Como destaca Nganvongpanit *et al.* (2015), es importante seccionar el hueso que se utilizará por la misma región en todos los ejemplares, para evitar la variación de las microestructuras en estudio, al igual que contemplar el factor de la edad ontogenética dado que las estructuras óseas sufren modificaciones acordes con cada intervalo etario. Esto último, es frecuentemente aplicado en estudios de antropología forense (Kerley, 1965; Ericksen, 1991). Sin embargo, en los estudios paleontológicos es muy complejo escoger el sector del material que se analizará, así como la edad del individuo al cual perteneció el fósil en estudio. Esto último, solo se puede determinar por el tamaño del fósil u otro elemento anatómico que permita la estimación de su edad (*e. g.*, dientes). Por lo tanto, este error puede ser muy importante a la hora de plantear diferencias significativas para una propuesta o una hipótesis de trabajo. Aunque Jowsey (1966), demuestra que en el fémur y en la tibia en *Homo sapiens*, las osteonas permanecen aproximadamente del mismo tamaño a lo largo de la vida, sin diferencias significativas. Esto mismo queda manifiesto en estudios con *Macaca mulatta* y en *Pan troglodytes*, en donde se demuestra que la variación en la microestructura ósea ocurre independientemente del sexo, la edad y el peso corporal (Burr, 1992; Mulhern y Ubelaker, 2003). Otros trabajos han determinado que los canales de Havers aumentan de tamaño con la edad en la corteza del fémur en *Homo sapiens*, pero permanecen del mismo tamaño en las costillas (Jowsey, 1966). Otro factor a tener en cuenta, es el tamaño de las osteonas y la densidad de las mismas que varía en los distintos huesos. En piezas con mayor tensión y compresión las osteonas son más pequeñas, más circulares y hay más cantidad (Skedros *et al.*, 1994; 1997; 2004; Mason *et al.*, 1995).



Los estudios en la microestructura de huesos largos de xenartros extintos y no extintos, así como de animales domésticos como la vaca y el cerdo, han permitido obtener diferencias que pueden ser aplicadas para separar taxones (Martiniakova *et al.*, 2006; Straehl *et al.*, 2013). Este trabajo podría constituir la primera aproximación para futuros estudios con material de Gomphotheriidae en América. Es importante formar una biblioteca de información y valores de significación, que permitan comparar material para ir clasificando fósiles muy complejos de asignar a una especie u otra, mediante la forma tradicional.

**7- MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA EN LA SUPERFICIE OCLUSAL DE
MOLARES DE GONFOTERIO AMERICANO: CUVIERONIUS
HYODON, CUVIERONIUS TROPICUS, NOTIOMASTODON
PLATENSIS Y STEGOMASTODON SP.**



7.1- Introducción

Los trabajos de morfometría dentaria son muy numerosos en los estudios del orden Proboscidea (*e. g.*, Aguirre, 1968; Tassy, 2014), y son muy relevantes para entender las relaciones de la familia Gomphotheriidae en América (*e. g.*, Frassinetti y Alberdi, 2000; Alberdi *et al.*, 2002; Tapia-Ramírez *et al.*, 2013). Las nuevas técnicas para trabajar con las formas y las dimensiones, como la morfometría geométrica, no han tenido el impacto que se podría esperar en las problemáticas del grupo. Las nuevas alternativas, para abordar los desafíos desde otra perspectiva morfológica, han sido bastante escasos. Sin embargo, trabajos como el de Paunović *et al.* (2016), en donde se analiza la diferencia de la forma de la mandíbula entre *Mammuthus primigenius* y *Mammuthus trogontherii*, con resultados significativos, hacen pensar en la probabilidad de que en un futuro próximo el uso de esta herramienta se generalice. Por lo cual, este capítulo plantea un especial interés.



7.2- Objetivo del estudio

- Reconocer, a través de la morfometría geométrica, con los m3 (derecho e izquierdo), diferencias o semejanzas entre los taxones de gonfoterios americanos.
- Conseguir una identificación morfogeométrica, por medio de los *landmarks* y semi- *landmarks* seleccionados.
- Evaluar la variabilidad de los m3 (derechos e izquierdo) de los gonfoterios americanos.
- Apoyar o refutar, las actuales agrupaciones y clasificaciones de la familia Gomphotheriidae en América.

7.3- Resultados

Con el programa MorphoJ, se realizó la Alineación de Procrustes por suma de cuadrados y la alineación por ejes principales, la cual alinea las coordenadas por los ejes o *landmarks* fijados (Zelditch *et al.*, 2004; Aguirre y Jiménez-Prado, 2018), eliminando la distorsión de la escala, rotación y cambios en la forma de traslación. A partir de esto, la diferencia entre los *landmarks*, se interpretan como diferencias de forma. Esto se puede observar en la figura 7.1, para ambos grupos de molares m3 (izquierdo y derecho).

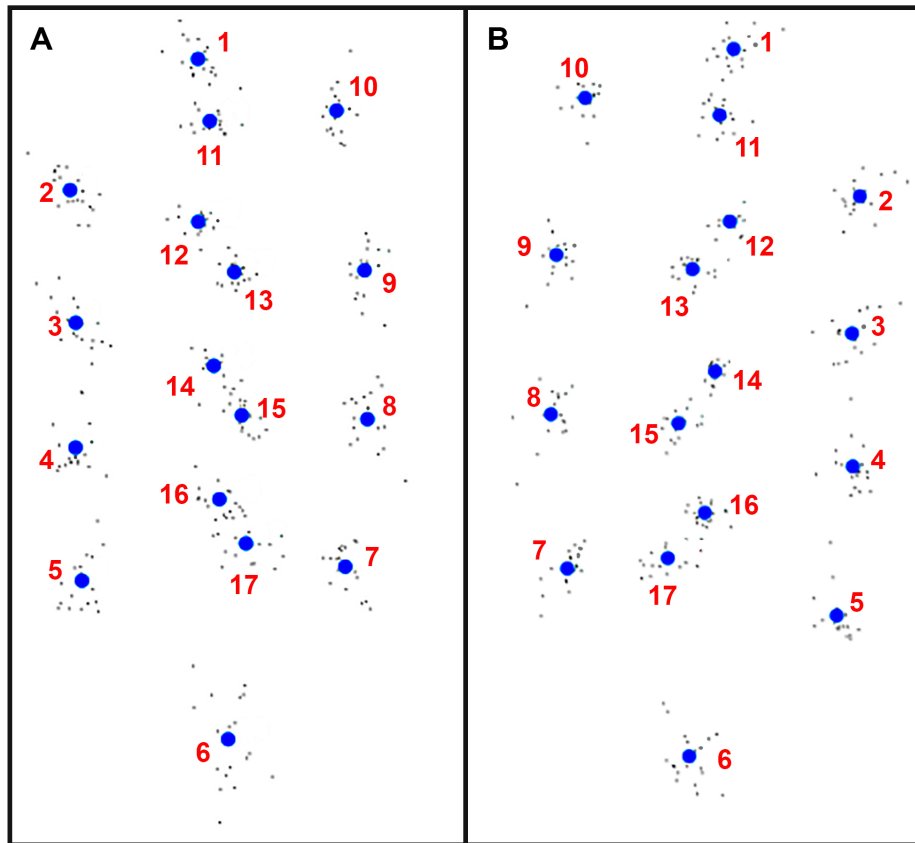


Figura 7.1- Imagen con los *landmarks*/semi-*landmarks* consensuados. **A.** m3 izquierdo y **B.** m3 derecho. Los números representan los *landmarks*/semi-*landmarks*, los puntos azules representan el promedio (consensuados) de los *landmarks*/semi-*landmarks*. Los puntos negros representan los *landmarks*/semi-*landmarks* individuales de las muestras.

Se generó la Matriz de Covarianza después de hacer la Superposición de Procrustes (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018), con lo cual se pudo hacer el ACP (Fig. 7.2). En la figura 7.3 se aprecian los porcentajes de varianza, asociados a los Componentes Principales (CP). Luego, mediante los *landmarks* de referencia se logró constituir la figura promedio de cada molar modificada según el CP 1 y 2 (Fig. 7.4) para poder así observar los cambios de forma, asociados a ellos. Los valores del porcentaje de la varianza que explica cada componente principal están en la tabla 7.1.

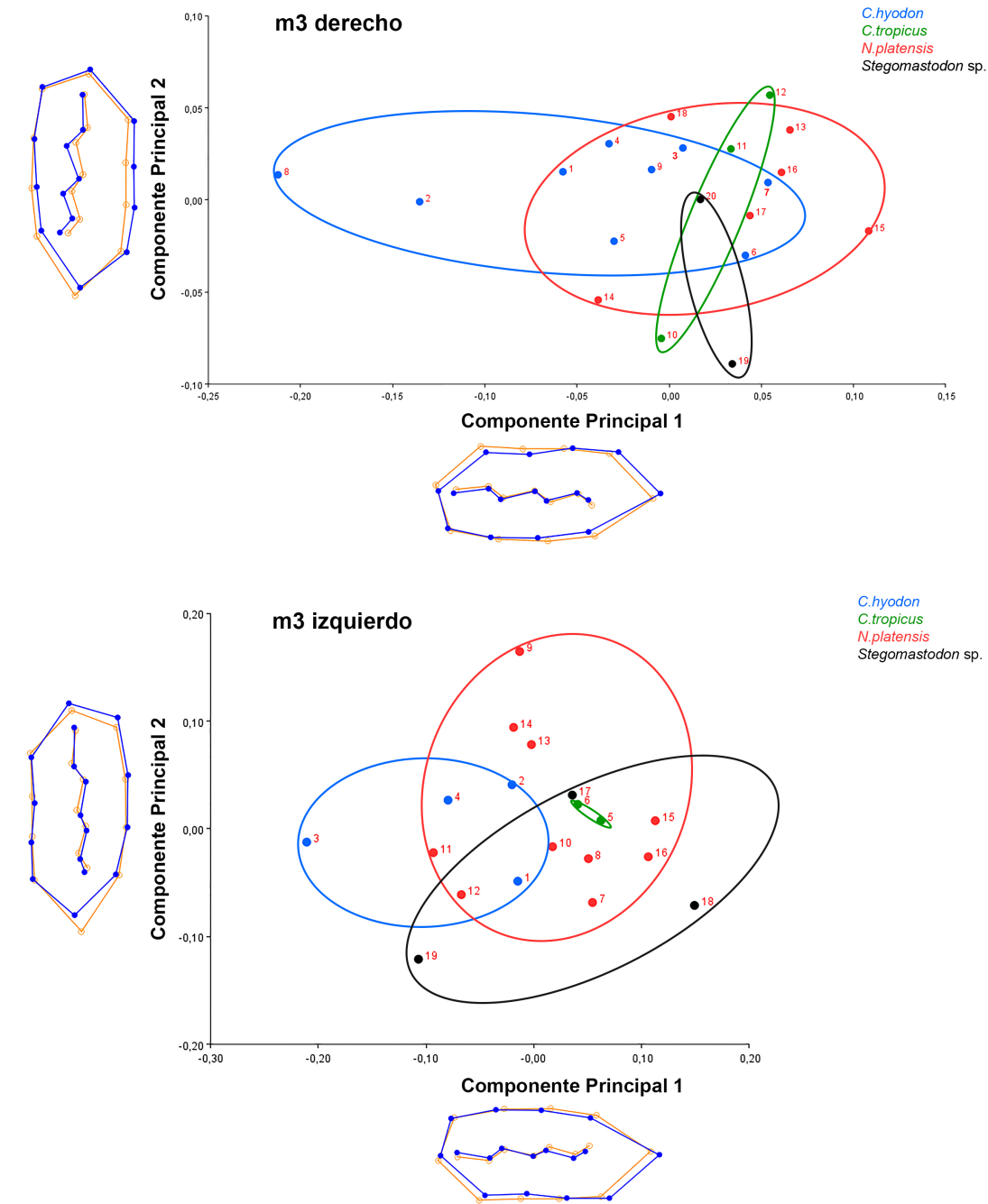


Figura 7.2- Gráfico de dispersión de ACP, para los m3 derecho (arriba) e izquierdo (abajo). En cada gráfico de Componentes Principales, se observa la figura promedio de cada molar (color naranja) y sobre ella la figura tendencia del Componente Principal (color azul). Los números representan a **m3 derecho**: *C. hyodon*= 1. s/n (Guatemala), 2. UF 9741 (USA), 3. DMAS 517 (USA), 4. DMAS 694 (USA), 5. UMPE 0608 (México), 6. INAH-MRG s/n (México), 7. MPG 731 (México), 8. INAH-MRG s/n (México), 9. INAH-MRG 10-295048 (México); *C. tropicus*= 10. 1SSAP6-1 (El Salvador), 11. 2SSAP30-674 (El Salvador), 12.



2SSAP30-593 (El Salvador); *N. platensis*= 13. MHMOP/PI/15 (Chile), 14. MPAB-217 (Uruguay), 15. MOM 0001 (Brasil), 16. MAP 186 (Brasil), 17. MN 2602-V (Brasil), 18. MECN 82 (Ecuador); *Stegomastodon* sp.= 19. IGCU677-CTO2c (México), 20. IGCU408-CTO2c (México). **m3 izquierdo:** *C. hyodon*= 1. s/n (Guatemala), 2. UF 129033 (USA), 3. DMAS 694 (USA), 4. NMR. 7783 (Bolivia); *C. tropicus*= 5. 1SSAP6-120 (El Salvador), 6. 2SSAP30-593 (El Salvador); *N. platensis*= 7. NHMOP/PI/14 (Chile), 8. MNHN-909 (Uruguay), 9. MBR-s/n (Uruguay), 10. UACH.PV.CHO.01 (Chile), 11. MGJRG-3353/4 (Colombia), 12. DGM 121-M (Brasil), 13. MLP 43-V21-1 (Argentina), 14. MECN 82 (Ecuador), 15. MECN 82 (Ecuador), 16. MHMOP/LB/13 (Chile); *Stegomastodon* sp.= 17. IGCU2634-GT02 (México), 18. NMMNHS P-27395 (USA), 19. AMNHDVP 25000 (USA).

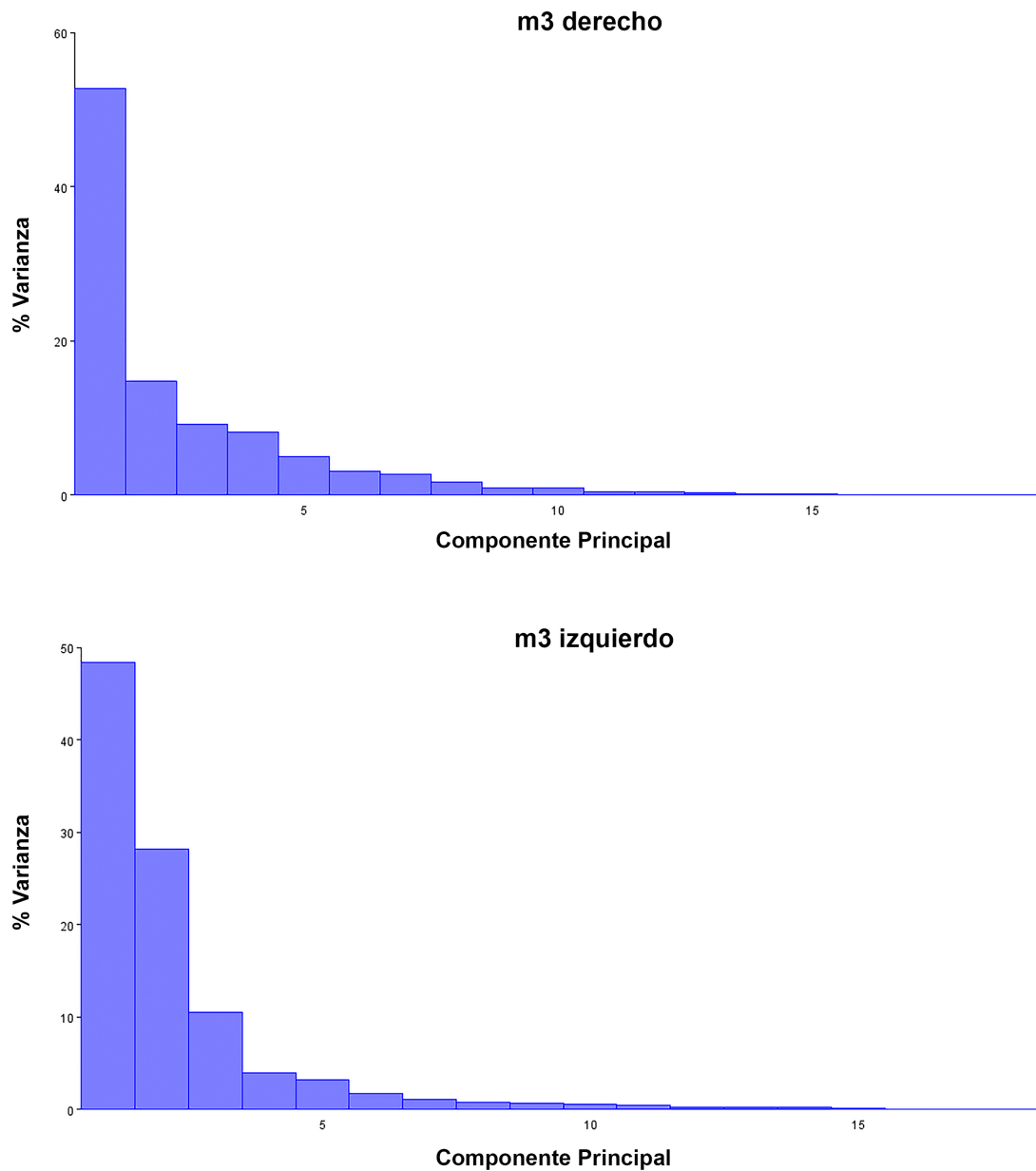


Figura 7.3- Porcentaje de varianza por cada CP, arriba para los m3 derecho, abajo para los m3 izquierdo.



m3 derecho		
CP	% Varianza	% Varianza Acumulativa
1	52,661	52,661
2	14,726	67,387
3	9,195	76,582
4	8,157	84,74

m3 izquierdo		
CP	% Varianza	% Varianza Acumulativa
1	48,345	48,345
2	28,192	76,537
3	10,454	86,991

Tabla 7.1- Valores obtenidos en el ACP. Se aprecia el porcentaje de la varianza que es explicado por cada uno de los CP. Además, se muestra el porcentaje de la varianza acumulativa de los CP. Solo se pusieron, arbitrariamente, los CP que explicaran más del 5% de la varianza.

Para los m3 derecho: varianza total: 0,01020347; Varianza de los *eigenvalues*: 0,0000009899538; varianza de *eigenvalue* escalada por el total de la varianza: 0,00951; varianza de *eigenvalue* escalada por el total de la varianza y el número de variables: 0,29510.

Para los m3 izquierdo: varianza total: 0,01556776; varianza de los *eigenvalues*: 0,0000023742484; varianza de *eigenvalue* escalada por el total de la varianza: 0,00980; varianza de *eigenvalue* escalada por el total de la varianza y el número de variables: 0,30403.

Además, se elaboró un gráfico de caja con el tamaño del centroide de ambos molares y de esta manera, poder observar las variaciones entre los grupos (Fig. 7.5).

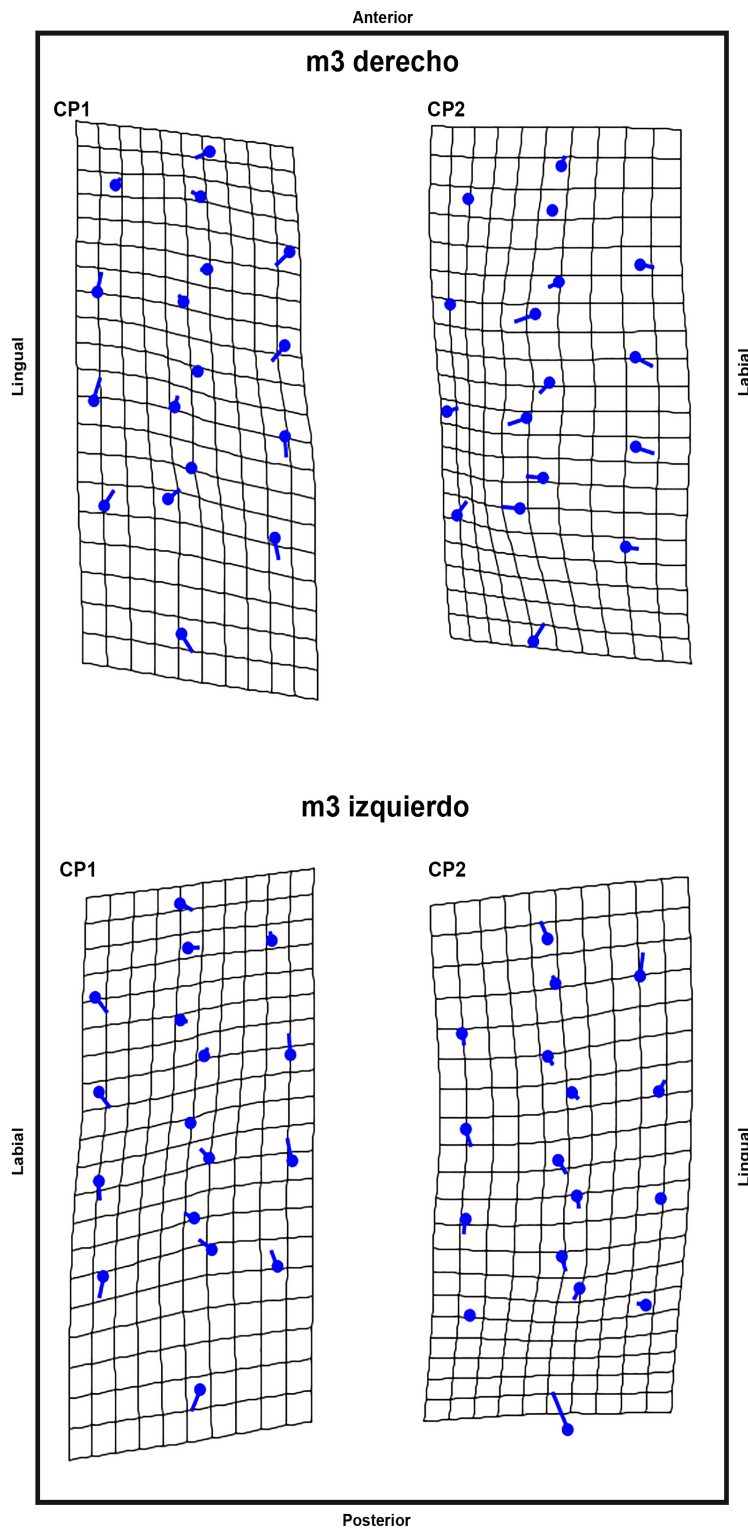


Figura 7.4- Grilla que representa como influye en la forma la CP 1 y 2, en ambos molares. La variación es la línea proyectada desde el punto.

También se llevó a cabo un Análisis de Variación Canónica (AVC) (Fig. 7.6, Tablas 7.2 y 7.3). El cual es utilizado para encontrar las mejores características



de la forma y distinguir entre grupos. Potencia la semejanza intragrupo, elevando las diferencias entre agrupaciones distintas (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018). Esto se hizo mediante el test de prueba de permutaciones para distancias pares (*Permutation test for pairwise distances*), que evalúa la significancia de las distancias por pares, realizando 10000 permutaciones (Aguirre y Jiménez-Prado, 2018).

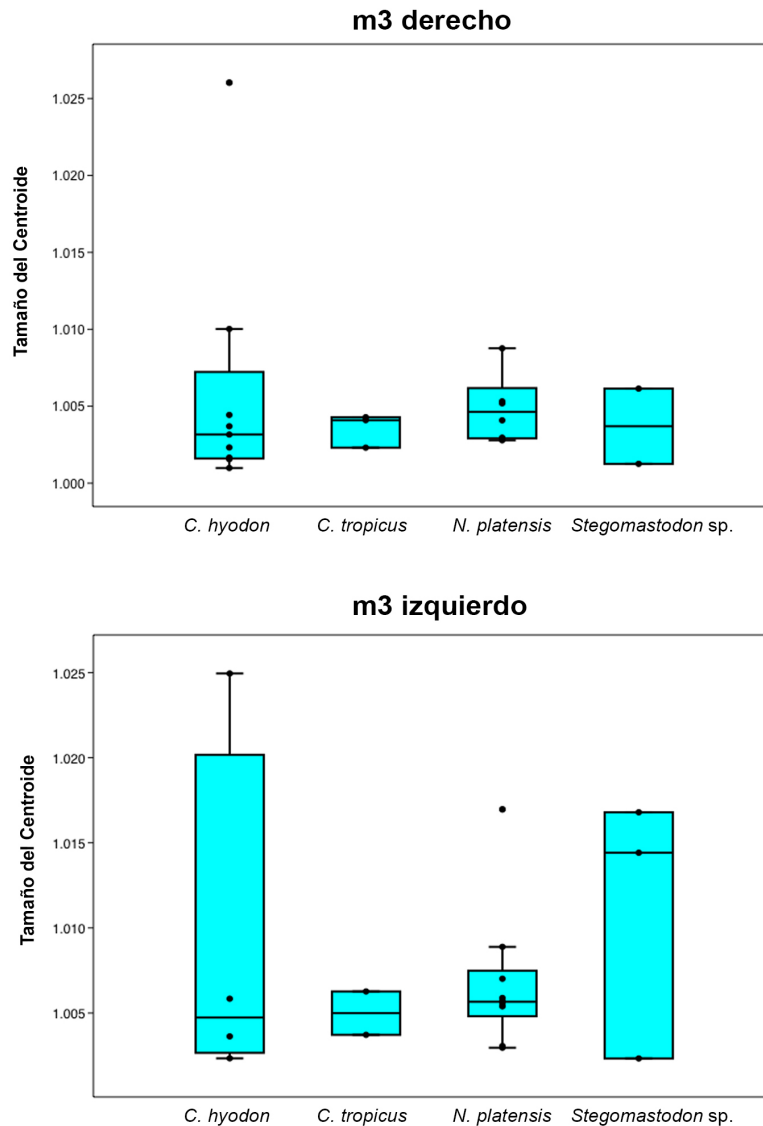


Figura 7.5- Gráfico de caja. Representa un resumen de la variación del tamaño del centroide de los m3 derecho (arriba) y m3 izquierdo (abajo). La línea del centro de la caja, representa la mediana de la muestra. Las líneas en forma de T, representan los valores más bajos y altos de la gama de los valores. El punto fuera del rango de *C. hyodon* (en m3 derecho), representa un valor que se sitúa fuera del rango. Lo mismo para el punto en *N. platensis* (m3 izquierdo).

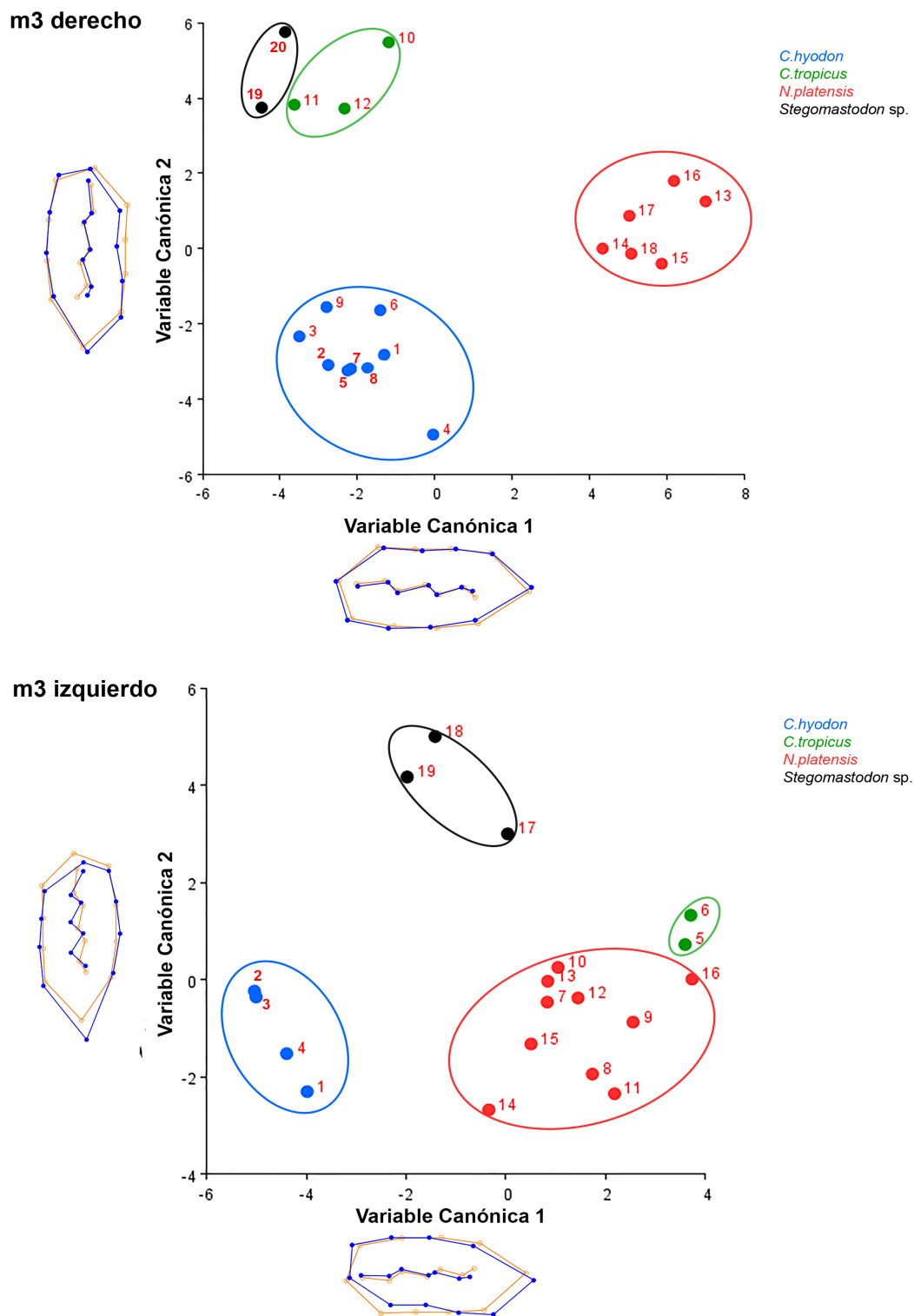


Figura 7.6- Gráficos de dispersión de (AVC), con los m3 derecho (arriba) e izquierdo (abajo). En cada gráfico de Variables Canónicas, se observa la figura promedio de cada molar (color naranja) y sobre ella la figura tendencia de la Variable Canónica (color azul). Los números representan a **m3 derecho**: *C.*



hyodon= 1. s/n (Guatemala), 2. UF 9741 (USA), 3. DMAS 517 (USA), 4. DMAS 694 (USA), 5. UMPE 0608 (México), 6. INAH-MRG s/n (México), 7. MPG 731 (México), 8. INAH-MRG s/n (México), 9. INAH-MRG 10-295048 (México); *C. tropicus*= 10. 1SSAP6-1 (El Salvador), 11. 2SSAP30-674 (El Salvador), 12. 2SSAP30-593 (El Salvador); *N. platensis*= 13. MHMOP/PI/15 (Chile), 14. MPAB-217 (Uruguay), 15. MOM 0001 (Brasil), 16. MAP 186 (Brasil), 17. MN 2602-V (Brasil), 18. MECN 82 (Ecuador); *Stegomastodon* sp.= 19. IGCU677-CTO2c (México), 20. IGCU408-CTO2c (México). **m3 izquierdo:** *C. hyodon*= 1. s/n (Guatemala), 2. UF 129033 (USA), 3. DMAS 694 (USA), 4. NMR. 7783 (Bolivia); *C. tropicus*= 5. 1SSAP6-120 (El Salvador), 6. 2SSAP30-593 (El Salvador); *N. platensis*= 7. NHMOP/PI/14 (Chile), 8. MNHN-909 (Uruguay), 9. MBR-s/n (Uruguay), 10. UACH.PV.CHO.01 (Chile), 11. MGJRG-3353/4 (Colombia), 12. DGM 121-M (Brasil), 13. MLP 43-V21-1 (Argentina), 14. MECN 82 (Ecuador), 15. MECN 82 (Ecuador), 16. MHMOP/LB/13 (Chile); *Stegomastodon* sp.= 17. IGCU2634-GT02 (México), 18. NMMNHS P-27395 (USA), 19. AMNHDVP 25000 (USA).

Haciendo un análisis de la forma en los m3 derecho, se aprecia que la CP 1 está compuesta, fundamentalmente, por variaciones del contorno del molar (Fig. 7.4). La CP 2, está más relacionada con movimientos desde la región central del molar, la zona postrite, hacia el costado lingual. A su vez, la zona pretrite, tiene un movimiento importante hacia labial. En los m3 izquierdo, la CP 1 tiene una variación de contorno. En la CP 2, se ve influenciada por el contorno, pero, además, por la variación de la zona posterior del molar. Sin embargo, en un vistazo general de los gráficos de dispersión, para m3 derecho e izquierdo, vemos conjuntos solapados sobre otros conjuntos. En los m3 derecho, la VC 1, muestra una importante influencia en la zona de los últimos *landmarks* (zona posterior) (Fig. 7.7). La VC 2, muestra variaciones tanto de la zona del contorno, como de los últimos *landmarks* en la zona posterior. En los m3 izquierdo, la influencia del VC 1 queda explícita con variaciones en todo el contorno del molar, con



importante influencia en la zona pretrite con un movimiento hacia el interior del molar y plegamiento de la grilla en la zona central-posterior. El VC 2 muestra importantes variaciones en la zona central, con movimientos hacia anterior. Además, muestra importante movimiento en la zona posterior del molar. Vemos que en el gráfico de dispersión del AVC para los m3 derecho, la principal VC que influye en las muestras de *Stegomastodon* sp. y *C. tropicus* es la VC 2. Mientras que para *C. hyodon* y *N. platensis*, la influencia va de lado de la VC 1. Para los m3 izquierdo, *Stegomastodon* sp. se inclina hacia el eje de VC2, seguida por *C. hyodon*. Mientras que en el eje de VC1, se ve una influencia en los grupos de *N. platensis* y *C. tropicus* (Fig. 7.6).

Para poner a prueba la validez de los grupos que formó el AVC, se hizo un Análisis de Función Discriminante (AFD) usando las Coordenadas de Procrustes, con 1000 itinerancias. Los valores que arrojo el ensayo, se pueden ver en las tablas 7.4 y 7.5.

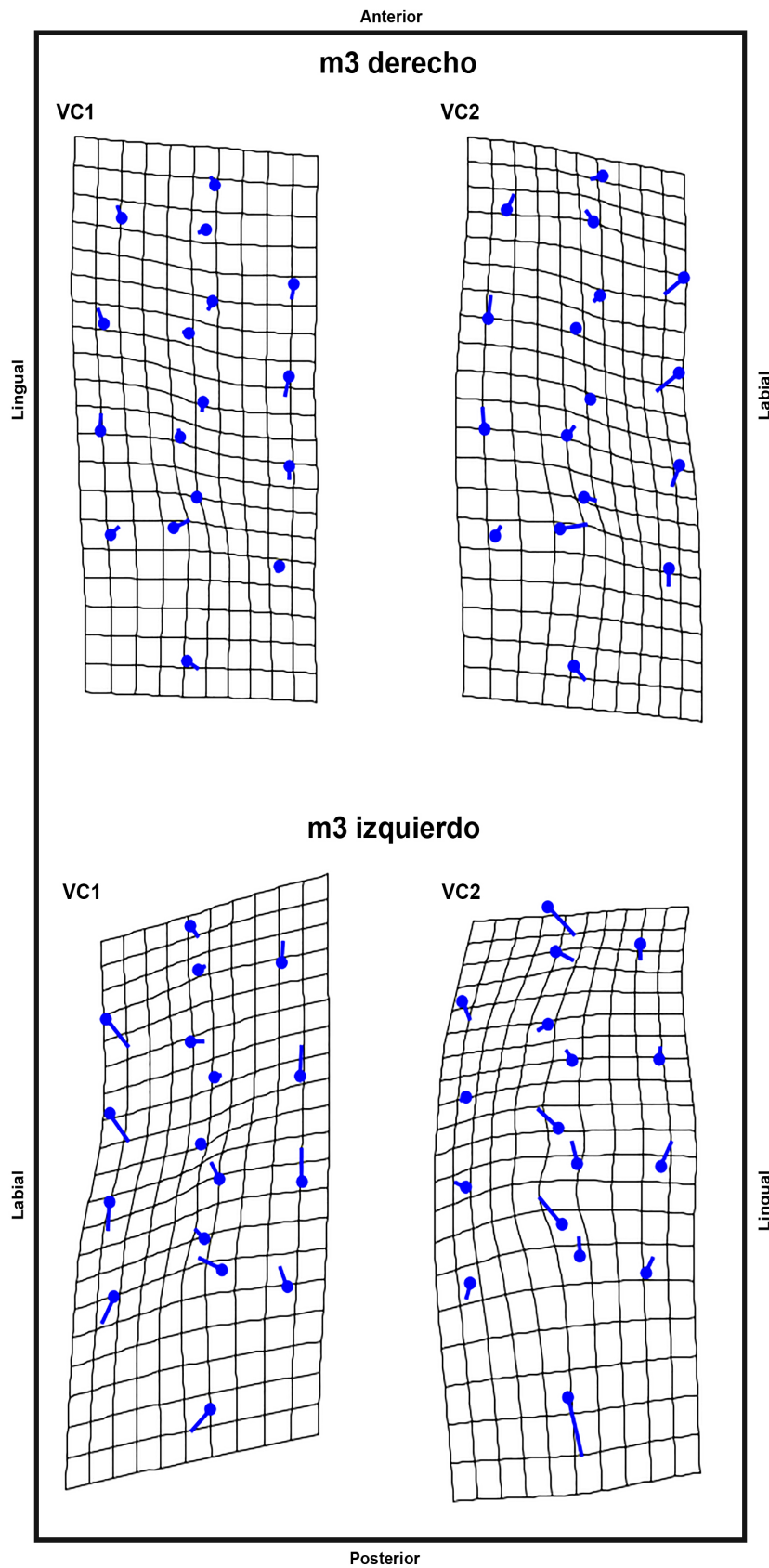


Figura 7.7- Grilla que representan como influye en la forma la VC 1 y 2, en ambos molares. La variación es la línea proyectada desde el punto.



Variación entre grupos, escalada por la inversa de la variación dentro del grupo:			
Variable Canónica	% Varianza		% V. Acumulativa
1	57,26		57,26
2	37,19		94,45
3	5,55		100
Distancia de Mahalanobis:			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	7,5085		
<i>N. platensis</i>	8,3292	9,0981	
<i>Stegomastodon</i> sp.	8,3744	5,0213	10,8896
P-valores de la prueba de permutación (10000 itinerancias) para la distancia de Mahalanobis (entre los grupos):			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	0,0047		
<i>N. platensis</i>	0,0002	0,0028	
<i>Stegomastodon</i> sp.	0,0186	0,1022	0,0136
Distancia Procrustes entre los grupos:			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	0,0772		
<i>N. platensis</i>	0,0937	0,0412	
<i>Stegomastodon</i> sp.	0,0997	0,0821	0,0767
P-valores de la prueba de permutación (10000 itinerancias) para la Distancia Procrustes (entre los grupos):			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	0,2432		
<i>N. platensis</i>	0,028	0,9101	
<i>Stegomastodon</i> sp.	0,1889	0,3941	0,3751

Tabla 7.2- Resultados del AVC. Se muestran las varianzas de las Variables Canónicas, Distancia de Mahalanobis y la Distancia Procrustes para los molares m3 derecho.



Variación entre grupos, escalada por la inversa de la variación dentro del grupo:			
Variación Canónica	% Varianza	%V. Acumulativa	
1	55,906	55,906	
2	27,089	82,995	
3	17,005	100	

Distancia de Mahalanobis:			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	8,9534		
<i>N. platensis</i>	6,3267	5,4513	
<i>Stegomastodon</i> sp.	6,5242	7,3333	5,657

P-valores de la prueba de permutación (10000 itinerancias) para la distancia de Mahalanobis (entre los grupos):			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	0,0673		
<i>N. platensis</i>	0,0008	0,0074	
<i>Stegomastodon</i> sp.	0,0031	0,0972	0,0003

Distancia Procrustes entre los grupos:			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	0,1462		
<i>N. platensis</i>	0,1046	0,0877	
<i>Stegomastodon</i> sp.	0,1303	0,1059	0,0765

P-valores de la prueba de permutación (10000 itinerancias) para la Distancia Procrustes (entre los grupos):			
	<i>C. hyodon</i>	<i>C. tropicus</i>	<i>N. platensis</i>
<i>C. tropicus</i>	0,1322		
<i>N. platensis</i>	0,0819	0,4876	
<i>Stegomastodon</i> sp.	0,2785	0,7032	0,456

Tabla 7.3- Resultados del AVC. Se muestran las varianzas de las Variables Canónicas, Distancia de Mahalanobis y la Distancia Procrustes para los molares m3 izquierdo.

**Comparación entre *C. hyodon* - *C. tropicus*****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,07722411

Distancia Mahalanobis: 3,7298

T²: 31,3011

P-valor (paramétrico): 0,8958

P-valores para pruebas de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,2130

T²: 0,2300**Comparación entre *C. hyodon* - *N. platensis*****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,09369311

Distancia Mahalanobis: 5,6232

T²: 113,8351

P-valor (paramétrico): 0,7553

P-valores para pruebas de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,0190

T²: 0,0380**Comparación entre *C. hyodon* - *Stegomastodon* sp.****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,09972120

Distancia Mahalanobis: 4,2658

T²: 29,7765

P-valor (paramétrico): 0,8665

P-valores para pruebas de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,2080

T²: 0,2020**Comparación entre *C. tropicus* - *N. platensis*****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,04124424

Distancia Mahalanobis: 1,1036

T²: 2,4359

P-valor (paramétrico): 0,9972

P-valores para pruebas de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,9050

T²: 0,9410



Comparación entre *C. tropicus* – *Stegomastodon* sp.

Diferencia entre las medias:

Distancia Procrustes: 0,08210856

Distancia Mahalanobis: 1,3343

T²: 2,1365

P-valor (paramétrico): 0,8675

P-valores para pruebas de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,3930

T²: 0,4870

Comparación entre *N. platensis* – *Stegomastodon* sp.

Diferencia entre las medias:

Distancia Procrustes: 0,07674955

Distancia Mahalanobis: 1,9428

T²: 5,6615

P-valor (paramétrico): 0,9548

P-valores para pruebas de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,3660

T²: 0,6840

Tabla 7.4- Se muestran los valores del AFD en los m3 derecho, compuesta por: Diferencias entre medias y P-valor para las pruebas de permutación. La prueba de permutación que usa la estadística de T² es equivalente a la distancia de Mahalanobis.

**Comparación entre *C. hyodon* - *C. tropicus*****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,14621869

Distancia Mahalanobis: 2,8951

T²: 11,1757

P-valor (paramétrico): 0,7024

P-valores para prueba de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,1380

T²: 0,2380**Comparación entre *C. hyodon* - *N. platensis*****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,10462201

Distancia Mahalanobis: 3,5298

T²: 35,5977

P-valor (paramétrico): 0,9327

P-valores para prueba de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,0820

T²: 0,1350**Comparación entre *C. hyodon* - *Stegomastodon* sp.****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,13029940

Distancia Mahalanobis: 1,8937

T²: 6,1475

P-valor (paramétrico): 0,9002

P-valores para prueba de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,2800

T²: 0,2430**Comparación entre *C. tropicus* - *N. platensis*****Diferencia entre las medias:**

Distancia Procrustes: 0,08771386

Distancia Mahalanobis: 4,8194

T²: 38,7116

P-valor (paramétrico): 0,8609

P-valores para prueba de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,4890

T²: 0,0120



Comparación entre *C. tropicus* – *Stegomastodon* sp.

Diferencia entre las medias:

Distancia Procrustes: 0,10590387

Distancia Mahalanobis: 1,3981

T²: 2,3456

P-valor (paramétrico): 0,8550

P-valores para prueba de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,6930

T²: 0,4370

Comparación entre *N. platensis* – *Stegomastodon* sp.

Diferencia entre las medias:

Distancia Procrustes: 0,07650879

Distancia Mahalanobis: 3,1669

T²: 23,1450

P-valor (paramétrico): 0,9570

P-valores para prueba de permutación (1000 itinerancias):

Distancia Procrustes: 0,4280

T²: 0,6180

Tabla 7.5- Se muestran los valores del AFD en los m3 izquierdo, compuesta por: Diferencias entre medias y P-valor para las pruebas de permutación. La prueba de permutación que usa la estadística de T² es equivalente a la distancia de Mahalanobis.

7.4- Discusión

Los gráficos de dispersión del ACP (Fig. 7.2), muestran que los conjuntos de las cuatro formas están muy solapados. Las variables y sus combinaciones, de los cuales el CP 1 y 2 para los m3 derecho representan el 67 % de la varianza y para los m3 izquierdo el 76% de la varianza para cada análisis, no pueden discernir entre las agrupaciones. Esto también sucede en muchos trabajos de morfometría lineal, que han intentado separar géneros y especies de gonfoterios de América del Sur, obteniendo resultados parcialmente positivos, pero no concluyentes con el ACP (e. g., Frassinetti y Alberdi, 2000; Prado *et al.*, 2002;



Recabarren *et al.*, 2014). Por otra parte, los centroides, no reflejan una variación importante que permitan observar una clara diversidad de grupos.

El AVC, prueba ser una herramienta muy útil para abordar el problema de la clasificación de esta familia. Los gráficos de dispersión para el AVC (Fig. 7.6) indican que otra combinación de las mismas variables de forma, pueden ser discriminadas más eficientes que las del ACP. Si observamos los gráficos del AVC, no denotan solapamientos y pueden ser usados para discernir entre grupos. Explicando entre la VC 1 y 2 el 94% de la varianza total, en este caso. Esto podría apoyar las recientes modificaciones a la clasificación de los gonfoterios americanos (Ferretti, 2010; Lucas y Alvarado, 2010; Mothé *et al.*, 2012; 2013; 2017b). Donde ellos ponen en duda la existencia del género *Stegomastodon* en América del Sur y en su lugar otorgan validez al género *Notiomastodon*, con la especie *N. platensis* (Mothé *et al.*, 2012; 2013; 2017b).

Sin embargo, hay que hacer algunas consideraciones con respecto a los valores del AVC. Los P-valores, que es un valor de probabilidad ($P \leq 0,05$) (Schervish, 1996), muestran que no son significativas en las pruebas de permutación para la distancia de Mahalanobis que se hizo en los m3 derecho, para: *Stegomastodon* sp. - *C. tropicus*. Tampoco tienen significancia, en la prueba de permutación para la distancia de Procrustes en: *C. tropicus* - *C. hyodon*, *N. platensis* - *C. tropicus*, *Stegomastodon* sp. - *C. hyodon*, *Stegomastodon* sp. - *C. tropicus* y *Stegomastodon* sp. - *N. platensis* (Tabla 7.3). Sucede algo similar en los m3 izquierdo, en las pruebas de permutación para la distancia Mahalanobis en: *C. tropicus* - *C. hyodon* y *Stegomastodon* sp. - *C. tropicus*. Esto también se puede observar en las pruebas de permutación para la distancia de Procrustes en todas las combinaciones (Tabla 7.3). El AFD en los m3 derecho, arrojó que para el P-valor, el único significativo, fueron las pruebas permutación para la Distancia de



Procrustes y T^2 , en la comparación de *C. hyodon* - *N. platensis* (Tabla 7.4). Para los m3 izquierdo, el único valor significativo fue la prueba de permutación para la T^2 (Tabla 7.5).

Cabe señalar que aunque estadísticamente no hay pruebas significativas en esta investigación de grupos verdaderamente constituidos, si se pueden observar variaciones de forma, tanto en los CP como en las VC. Es probable, que la diferencia sea tan mínima, que para sustentar cualquier análisis que se haga en los molares, sea necesario apoyarla con otros elementos anatómicos.

Un punto importante es la forma en cómo se fijaron los *landmarks* y semi-*landmarks*. Puesto que son molares con una compleja estructura oclusal, no siempre se pueden encontrar puntos homólogos. Además, dado que las fotografías fueron obtenidas de publicaciones, no se pueden evitar los ángulos y distorsiones propias de una fotografía.

Con los resultados, no se puede inferir que hay una separación total de los molares, a través de su forma. Resultaría interesante, en un trabajo a futuro, utilizar otros restos esqueléticos (cráneos, mandíbulas etc.) que sirva de manera complementaria al estudio de los molares, y de esta forma tener una respuesta más global a todas las alternativas morfo-geométricas, que puedan ofrecer los fósiles de gonfoterio. Este es un primer trabajo que puede abrir el camino para poner a prueba otra alternativa para clasificar a los gonfoterios de América.



8- CONCLUSIONES



En esta tesis se han usado tres técnicas para analizar el material fósil de gonfoterio americano, las cuales comprenden, 1) elementos moleculares del fósil como el colágeno, 2) la arquitectura interna de los fósiles con mediciones en las osteonas y los canales de Havers y 3) la morfometría geométrica analizada en los terceros molares inferiores.

Las conclusiones para cada análisis se detallan a continuación:

8.1- Colágeno

- En esta tesis se usaron 70 muestras de fósiles de gonfoterio, provenientes de yacimientos de 11 países y que abarcan, desde elementos del esqueleto axial, como: mandíbula, costilla, cráneo, molares y defensa, hasta elementos de la cintura pélvica. Los resultados arrojaron 13 muestras positivas a la obtención del colágeno, todas provenientes de yacimientos de Chile.
- La diferencia en la conservación del material fósil de los gonfoterios americanos se ve reflejada en la supervivencia de las macromoléculas del colágeno. Esto denota el reservorio natural para macromoléculas, específicamente de la zona centro y sur de Chile, lo que otorga un componente importante para futuros estudios con macromoléculas en restos fósiles del Cuaternario chileno.
- Debido a que todas las muestras de gonfoterio presentaron el pico característico en los espectros (m/z 2020), se sostiene que todas las muestras que dieron positivo al colágeno (I) en esta tesis, se identificaron como gonfoterio.



- No se observaron nuevos picos en los espectros del colágeno diferentes a los encontrados en el análisis de los fósiles provenientes del yacimiento Pilauco del sur de Chile (Buckley *et al.*, 2019). Pese a que en este trabajo no fue posible incluir a todos los yacimientos de Chile, los resultados de este estudio sugieren la existencia de un único grupo de gonfoterios en el sur- oeste de América del Sur.

8.2- Histomorfometría

- En este estudio se reconoce el potencial de las variables métricas de las estructuras internas del hueso de gonfoterio, especialmente del área y del perímetro del canal de Havers en las mandíbulas, lo que podría mejorar enormemente las clasificaciones de la familia Gomphotheriidae en América. Sin embargo, emplearlas como un referente y atributo diagnóstico histológico no es posible aún, dado el número limitado de datos.

- Al observar los resultados no es posible hacer una diferenciación certera entre las estructuras internas de los fósiles de los gonfoterios *Cuvieronius hyodon*, *Stegomastodon platensis* y *Notiomastodon platensis*, lo que puede corresponder a un bajo número de comparaciones por elemento anatómico y por especie.

- El análisis histomorfométrico empleando distintas partes del esqueleto de los fósiles de gonfoterio arrojó diferencias, pero no una tendencia que pudiera servir para diferenciar los taxones.



- Como primera aproximación al estudio métrico de las osteonas y canales de Havers en gonfoterios de América, cabe destacar las posibilidades que se plantean y barajan cuando los fósiles presentan una buena conservación, capaz de permitir la toma de datos. Dado los escasos trabajos relacionados, y a que la mayoría de estos han sido realizados con material “fresco” de taxones modernos (Nganvongpanit *et al.*, 2015), este trabajo representa uno de los primeros en su género y destaca por las posibilidades reales en su ejecución con material fósil.

8.3- Morfometría geométrica

- Los molares que fueron utilizados en esta tesis, los terceros molares inferiores izquierdo y derecho, dieron un resultado positivo al análisis de morfometría geométrica.

- Los ACP hechos con los terceros molares inferiores (derecho e izquierdo), no evidenciaron una clara agrupación o separación entre ellos, pero si se observó una agrupación entre las muestras con el AVC. Este último puede ser una herramienta más eficiente que los ACP para separar los taxones de gonfoterio americano.

- La alta variabilidad métrica de los terceros molares inferiores quedó de manifiesto en el ACP, en donde todas las muestras se solaparon. Con el AVC sus diferencias pudieron ser agrupadas en los distintos taxones.



- Se hace necesario aumentar el número de individuos o muestras, así como agregar otras zonas del esqueleto, que sirvan para corroborar o refutar lo que se sabe hasta el momento con esta tesis.
- En América, aún existe disparidad de visiones y características diagnósticas para una forma de gonfoterio; *Stegomastodon* y sus especies representativas *Stegomastodon platensis* y *Stegomastodon waringi* (Alberdi y Prado, 1995; Prado *et al.*, 2005), contra el género *Notiomastodon* y su especie *Notiomastodon platensis* (Mothé *et al.*, 2012; 2013; 2017b). Los resultados de la morfometría geométrica de esta tesis apoyan la hipótesis propuesta por Mothé *et al.* (2012; 2013; 2017b).
- Debido a estas nuevas alternativas de usos analíticos, es recomendable seguir investigando las variantes y nuevas perspectivas que puedan entregar otras formas de análisis de variaciones morfológicas de los elementos anatómicos más comúnmente hallados en un yacimiento paleontológico, como son los molares.

8.4- Objetivos futuros

- El éxito de futuras investigaciones macromoleculares con el colágeno de los fósiles de gonfoterio y las nuevas discusiones y conclusiones que se puedan obtener, dependerá de la probabilidad de conseguir la huella del colágeno en fósiles de América del Norte, de material asignado a *Stegomastodon*, en cualquiera de sus especies. Así se podrá comparar ambos extremos de América y las secuencias de las formas de gonfoterio que allí habitaban, para desarrollar una discusión más detallada y más concisa de la dispersión de estos animales en el continente.



Chile se ensalza como un paraíso de la conservación de las macromoléculas como el colágeno y el ADN. Tomando como referencia los resultados de esta tesis los yacimientos de las zonas centrales hacia el sur, cuentan con una alta probabilidad de obtención de estas macromoléculas, por lo que se propone centrar los esfuerzos de recolección de muestra en estos yacimientos para ampliar los estudios de las macromoléculas, tanto en gonfoterios como en otras especies. A futuro habrá que centrar los estudios en la conservación de los 11 yacimientos muestreados, para comprender las causas por las cuales presentan una conservación excepcional de las macromoléculas. Así se podrá establecer un patrón para la búsqueda de yacimientos que compartan las características de conservación, evitando así los muestreos que tengan una baja probabilidad de obtención de resultados positivos.

- Esta tesis propone un patrón de lugares con más probabilidades de obtener resultados positivos a los análisis de macromoléculas, lo que podría servir para futuras investigaciones y así evitar búsquedas que puedan conllevar una pérdida de recursos y tiempo.

- Dada la naturaleza de las investigaciones en histomorfometría, la mayoría de las publicaciones se han desarrollado con huesos provenientes de animales actuales y, por lo tanto, la cantidad de material a ser estudiado no es un factor limitante. Dada la escasez del registro fósil, a menudo es restrictivo conseguir la cantidad suficiente de material comparativo, que sea representativo, para llevar a cabo una investigación a partir de los análisis histológicos. Dado los resultados obtenidos en esta tesis, sobre todo con las mandíbulas, uno de los primeros objetivos futuros deberá centrarse en aumentar la recolección de material, que



permita incrementar la información que ya se ha obtenido en el capítulo de histomorfometría de esta tesis doctoral.

- Como primera medida futura para complementar los análisis de morfometría geométrica de los terceros molares inferiores, planteo aumentar el número de individuos, así como sumar al análisis los demás molares de la serie dental. También, agregar más elementos esqueléticos que podrían servir para contrastar resultados y de esta forma el análisis se tornaría más resolutivo.

9- BIBLIOGRAFÍA



Adams, D. C., Rohlf, F. J. y Slice, D. E. (2004): Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology*. 71: 5-16.

Adams, D. C., Rohlf, J. F. y Slice, D. E. (2013): A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*. Vol. 24(1). 7-14.

Adler, C. J., Haak, W., Donlon, D., Cooper, A. y The Genographic Consortium. (2011): Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science*. 38: 956-964.

Aguirre, E. (1968): Revisión sistemática de los *Elephantidae* por su morfología y morfometría dentaria. *Estudios Geológicos*. 24: 109-167.

Aguirre, W. y Jiménez-Prado, P. (2018): Guía práctica de Morfometría Geométrica. Aplicaciones en la Ictiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Esmeraldas (PUCESE). pp. 104.

Aitken, A. (2005): Identification of Proteins by MALDI-TOF MS. En: *The Proteomics Protocols Handbook*. (Ed.): Walker, J. M. University of Hertfordshire, Hatfield, UK. p 319- 324.

Alberdi, M. T. y Corona, E. (2005): Revisión de los gonfoterios en el Cenozoico tardío de México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 22: 246-260.



Alberdi, M. T. y Prado, J. L. (1995): Los mastodontes de América del Sur. En: Evolución biológica y climática de la Región Pampeana durante los últimos 5 millones de años, Un ensayo de correlación con el Mediterráneo occidental. (Eds.): Alberdi, M. T., Leone, G. y Tonni, E. P. Monografías de Museo Nacional de Ciencias Naturales y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 12. pp. 277-292.

Alberdi, M. T., Prado, J. L. y Cartelle, C. (2002): El registro de *Stegomastodon* (Mammalia, Gomphotheriidae) en el Pleistoceno superior de Brasil. *Revista Española de Paleontología*. 17: 217-235.

Alberdi, M. T., Prado, J. L. y Salas, R. (2004): The Pleistocene Gomphotheriidae (Proboscidea) from Peru. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Abhandlungen*. 231: 423-452.

Alberdi, M. T., Juárez-Woo, J., Polaco, O. J. y Arroyo-Cabrales, J. (2009): Description of the most complete skeleton of *Stegomastodon* (Mammalia, Gomphotheriidae) recorded for the Mexican Late Pleistocene. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie Abhandlungen*. 251: 239-255.

Ambler, R. P. y Daniel, M. (1991): Proteins and molecular palaeontology. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*. 333: 381-389.

Ameghino, F. (1888): Rápida diagnosis de algunos mamíferos fósiles nuevos de la República Argentina. *Obras Completas*, Buenos Aires. 5: 469-480.



Andrews, C. W. (1906): A Descriptive Catalogue of the Tertiary Vertebrata of the Fayum, Egypt. British Museum of Natural History, London. pp. 324.

Arroyo-Cabrales, J., Polaco, O. J., Laurito, C., Johnson, E., Alberdi, M. T. y Zamora, A. L. V. (2007): The proboscideans (Mammalia) from Mesoamerica. *Quaternary International*. 169-170: 17-23.

Asara, J. M., Schewietzer, M. H., Freimark, L. M., Phillips, M. y Cantley, L. C. (2007): Protein Sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* Revealed by Mass Spectrometry. *Science*. 316: 280-285.

Austin, J. J., Smith, A. B. y Thomas, R. H. (1997): Palaeontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA. *Trends in Ecology and Evolution*. 12: 303-306.

Baab, K. L., McNulty, K. P. y Rohlf, F. J. (2012): The Shape of Human Evolution: A Geometric Morphometrics Perspective. *Evolutionary Anthropology*. 21: 151-165.

Barriel, V., Thuet, E. y Tassy, P. (1999): Molecular phylogeny of Elephantidae. Extreme divergence of the extant forest African elephant. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III*. 322: 447-454.

Behrensmeyer, A. K. (1978): Taphonomic and ecologic information from bone weathering. *Paleobiology*. 4: 150-162.



Benoit, J., Crochet, J. Y., Mahboubi, M., Jaeger, J. J., Bensalah, M., Adaci, M. y Tabuce, R. (2015): New material of *Seggeuris amourensis* (Paenungulata, Hyracoidea), including a partial skull with intact basicranium. *Journal of Vertebrate Paleontology*. 36: e1034358.

Benoit, J., Crumpton, N., Mérigeaud, S. y Tabuce, R. (2013): A memory already like an elephant's? The advanced brain morphology of the last common ancestor of Afrotheria (Mammalia). *Brain Behavior and Evolution*. DOI: 10.1159/000348481

Benton, M. J. y Harper, D. A. T. (2009): Introduction to Paleobiology and the Fossil Record. Wiley-Blackwell. pp. 592.

BIAZA. (2006): Management Guidelines for the Welfare of Zoo Animals: Elephants. 2 edición. British and Irish Association of Zoos and Aquariums. London. pp. 217.

Bloom, W. y Fawcett, D. W. (1994): Bone. En: A Textbook of Histology, 12th ed. (Eds.): Bloom, W. y Fawcett, D. W. Chapman & Hall, New York, NY. pp. 194-233.

Boivin, G. y Meunier, P. J. (1993): Histomorphometric Methods Applied to Bone. En: Histology of Ancient Human Bone: Methods and Diagnosis. (Eds.): Grupe, G. y Garland, A. N. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 137-156.

Bookstein, F. L. (1991): Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology. Cambridge University Press. pp. 435.



Bookstein, F. L. (1996): Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology*. 58: 313-365.

Brown, T. A. y Brown, K. (1992): Ancient DNA and the archaeologist. *Antiquity*. 66:10-23.

Brown, K. A. y Brown, T. A. (2013): Biomolecular Archaeology. *Annual Review of Anthropology*. 42: 159-174.

Buckley, M. (2018): Zooarchaeology by Mass Spectrometry (ZooMS) Collagen Fingerprinting for the Species Identification of Archaeological Bone Fragments. En: *Zooarchaeology in Practice, Case Studies in Methodology and Interpretation in Archaeofaunal Analysis*. (Eds.) Giovas, C. M. y LeFebvre, M. J. Springer International Publishing. p. 227-247.

Buckley, M. (2016): Species Identification of Bovine, Ovine and Porcine Type 1 Collagen; Comparing Peptide Mass Fingerprinting and LC-Based Proteomics Methods. *International Journal Molecular Sciences*. 17: 445. doi:10.3390/ijms17040445

Buckley M. (2015): Ancient collagen reveals evolutionary history of the endemic South American 'ungulates'. *Proceedings of the Royal Society B*. 282: 20142671. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.2671>



Buckley, M. y Kansa, S. W. (2011): Collagen fingerprinting of archaeological bone and teeth remains from Domuztepe, South Eastern Turkey. *Archaeological and Anthropological Sciences*. 3: 271-280.

Buckley, M., Kansa, S. W., Howard, S., Campbell, S., Thomas-Oates, J. y Collins, M. (2010): Distinguishing between archaeological sheep and goat bones using a single collagen peptide. *Journal of Archaeological Science*. 37: 13-20.

Buckley, M. y Collins, M. J. (2011): Collagen survival and its use for species identification in Holocene-lower Pleistocene bone fragments from British archaeological and paleontological sites. *Antiqua*. 1: e1.

Buckley, M., Collins, M. y Thomas-Oates, J. (2008a): A method of isolating the collagen (I) $\alpha 2$ chain carboxytelopeptide for species identification in bone fragments. *Analytical Biochemistry*. 374: 325-334.

Buckley, M., Collins, M., Thomas-Oates, J. y Wilson, J. C. (2009): Species identification by analysis of bone collagen using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 23: 3843- 3854.

Buckley, M., Fraser, S., Herman, J., Melton, N. D., Mulville, J. y Pálisdóttir, A. H. (2014): Species identification of archaeological marine mammals using collagen fingerprinting. *Journal of Archaeological Science*. 41:631-641.



Buckley, M., Gu, M., Shameer, S., Patel, S. y Chamberlain, A. T. (2016): High-throughput collagen fingerprinting of intact microfaunal remains; a low-cost method for distinguishing between murine rodent bones. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 30:1-8.

Buckley, M., Larkin, N. y Collins, M. (2011): Mammoth and Mastodon collagen sequences; survival and utility. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 75: 2007-2016.

Buckley, M., Recabarren, O. P., Lawless, C., García, N. y Pino, M. (2019): A molecular phylogeny of the extinct South American gomphothere through collagen sequence analysis. *Quaternary Science Reviews*. En prensa.

Buckley, M., Walker, A., Ho, S. Y. W., Yang, Y., Smith, C., Ashton, P., Oates, J. T., Cappellini, E., Koon, H., Penkman, K., Elsworth, B., Ashford, D., Solazzo, C., Andrews, P., Strahler, J., Shapiro, B., Ostrom, P., Gandhi, H., Miller, W., Raney, B., Zylber, M. I., Gilbert, M. T. P., Prigodich, R. V., Ryan, M., Rijdsdijk, K. F., Janno, A. y Collins, M. J. (2008b): Comment on "Protein Sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* Revealed by Mass Spectrometry". *Science*. 319: 33c.

Burr, D. B. (1992): Estimated Intracortical Bone Turnover in the Femur of Growing Macaques: Implications for Their Use as Models in Skeletal Pathology. *The Anatomical Record*. 232: 180-189.

Cabrera, A. (1930): Una revisión de los mastodontes argentinos. *Revista del Museo de La Plata*. 32: 61-144.



Campbell, K. E. Jr., Frailey, C. D. y Romero-Pittman, L. (2000): The late Miocene gomphothere *Amahuacatherium peruvium* (Proboscidea: Gomphotheriidae) from Amazonian Peru: Implications for the Great American Faunal Interchange. *Instituto Geológico Minero y Metalúrgico, Serie D: Estudios Regionales, Boletín*. 23: 1-152.

Campbell, K. E. Jr., Frailey, C. D. y Romero-Pittman, L. (2009): In defense of *Amahuacatherium* (Proboscidea: Gomphotheriidae). *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie*. 252:113–128.

Carrillo-Briceño, J. D. (2011): Los Mastodontes y sus Parientes: El registro fósil de los Proboscidos. En: Venezuela Paleontológica: Evolución de la biodiversidad en el pasado geológico. (Ed.): Sánchez-Villagra, M. R. Publisher: Printwork Art GmbH, St. Gallen. pp. 313-322.

Cisneros, J. C. (2005): New Pleistocene vertebrate fauna from El Salvador. *Revista Brasileira de Paleontología*. 8: 239-255.

Cisneros, J. C. (2008): The fossil mammals of El Salvador. *Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*. 44: 375-380.

Collins, M. J. (1995): A basic Mathematical Simulation of the Chemical Degradation of Ancient Collagen. *Journal of Archaeological Science*. 22: 175-183.

Collins, M. J. (2008b): Comment on “Protein Sequences from Mastodon and *Tyrannosaurus rex* Revealed by Mass Spectrometry”. *Science*. 319: 33c.



Collins, M., Buckley, M., Grundy, H. H., Thomas-Oates, J., Wilson, J. y van Doorn, N. (2010): ZooMS: The collagen barcode and fingerprints. *Spectroscopy Europe*. 22: 6-10.

Collins, M. J., Cappellini, E., Buckley, M., Penkman, K. E. H., Griffin, R. C. y Koon, H. E. C. (2005): Analytical methods to detect ancient proteins. En: *Bio and Material Cultures at Qumran*. (Eds.): Gunneweg, K., Greenblatt, C. y Adriaens, A. Papers from a COST Action G8 working group meeting held in Jerusalem. pp. 33-40.

Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I. y Roberts, J. P. (2002): The survival of Organic Matter in Bone: A Review. *Archaeometry*. 44: 383-394.

Collins, M.J., Walton, D. y King, A. (1998): The Geochemical Fate of Proteins. En: *Nitrogen-Containing Macromolecules in the Bio- and Geosphere*. (Eds.) Stankiewicz, B. A. y van Bergerp, P. F. ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, DC. p. 74-87.

Cook, S. F., Brooks, S. T. y Ezra-Cohn, H. E. (1962): Histological Studies on Fossil Bone. *Journal of Paleontology*. 36: 483-494.

Covington, A., Song, L., Suparno, O., Koon, H. y Collins, M. (2008): Link-lock: An explanation of the chemical stabilisation of collagen. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*. 92: 1-7.

Cring, F. D. (1986): Enamel Prism Patterns in Proboscidean Molar Teeth. *Elephant*. 2: 72-79.



Cuvier, G. (1817): Le Règne Animal. V. 1. Paris: Detèrville. 540 pp.

Danquah, E. y Oppong, S. K. (2014): Survey of Forest Elephants *Loxodonta cyclotis* (Matschie, 1900) (Mammalia: Proboscidea: Elephantidae) in the Bia Conservation Area, Ghana. *Journal of Threatened Taxa*. 6: 6399-6405.

Debruyne, R. (2005): A case study of apparent conflict between molecular phylogenies: the interrelationships of African elephants. *Cladistics*. 21: 31-50.

de Jong, W. W. (1998): Molecules remodel the mammalian tree. *Trends in Ecology and Evolution*. 13: 270-275.

Delesse, M. (1847): Procède mecanique pour determiner la composition des roches. *C R Acad Sci Paris*. 25: 544-552.

Delmer, C., Mahboubi, M., Tabuce, R. y Tassy, P. (2006): A new species of *Moeritherium* (Proboscidea, Mammalia) from the Eocene of Algeria: new perspectives on the ancestral morphotype of the genus. *Palaeontology*. 49: 421-434.

Dryden, I. L. y Mardia, K. V. (2012): Statistical Shape Analysis with Applications in R. Wiley. pp. 454.

Edman, P. (1950): Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chemica Scandinavica*. 4: 283-293.



Eglinton, G. y Logan, G. A. (1991): Molecular preservation. *Philosophical Transactions The Royal Society London B*. 333: 315-328.

Elewa, A. M. T. (2004): *Morphometrics Applications in Biology and Paleontology*. Springer. pp. 263.

Enk, J., Devault, A., Debruyne, R., King, C. E., Treangen, T., O'Rourke, D., Salzberg, S. L., Fisher, D., MacPhee, R. y Poinar, H. (2011): Complete Columbian mammoth mitogenome suggests interbreeding with woolly mammoths. *Genome Biology*. 12: 12: R51 <http://genomebiology.com/2011/12/5/R51>

Ericksen, M. F. (1991): Histological estimation of age at death using the anterior cortex of the femur. *American Journal of Physical Anthropology*. 84: 171-179.

Eurell, J. A. C. (2004): *Veterinary Histology*. Teton NewMedia. pp. 87.

Ezra, H. C. y Cook, S. F. (1959): Histology of Mammoth Bone. *Science*. 129: 465-466.

Fariña, R. A., Vizcaíno, S. F. y Iullis, de G. (2013): *Megafauna, giant beasts of Pleistocene South America*. Indiana University Press. pp. 437

Fernández-López, S. (1998): *Tafonomía y fosilización*. En: *Tratado de Paleontología*, tomo I. (Eds.) Meléndez, B. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. p. 51-441.



Fernández - López, S. R. (2000): Temas de Tafonomía. Departamento de Paleontología, Universidad Complutense de Madrid. pp. 167.

Fernández-López, S. (2001): Tafonomía, fosilización y yacimientos de fósiles: modelos alternativos. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*. 9: 116-120.

Ferretti, M. P. (2008): A review of South American Proboscideans. Neogene Mammals. *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*. 44: 381-392.

Ferretti, M. P. (2010): Anatomy of *Haplomastodon chimborazi* (Mammalia, Proboscidea) from the late Pleistocene of Ecuador and its bearing on the phylogeny and systematics of South American gomphotheres. *Geodiversitas*. 32: 663-721.

Fischer, M. S. (1989): Hyracoids, The Sister-Group of Perissodactyls. En: The Evolution of Perissodactyls. (Eds.): Prothero y R. Schoch. Oxford University Press, New York. pp. 37-56.

Forasiepi, A. M., Sánchez-Villagra, M. R. y Hoyos, J. M. (2012): La Paleontología: Estudio de la Biodiversidad Extinta en un Marco Evolutivo. En: Venezuela paleontológica: evolución de la biodiversidad en el pasado geológico. (Eds.): Sánchez-Villagra. Printwork Art GmbH, St. Gallen Zürich. pp. 15-34.

Frassinetti, D. y Alberdi, M. T. (2000): Revision y estudio de los restos fosiles de mastodontes de Chile (Gomphotheriidae): *Cuvieronius hyodon*, Pleistoceno Superior. *Estudios Geológicos*. 56: 197-208.



Frassinetti, D. y Alberdi, M. T. (2005): Presencia del género *Stegomastodon* entre los restos fósiles de mastodontes de Chile (Gomphotheriidae), Pleistoceno Superior. *Estudios Geológicos*. 61:101-107.

Gadens, G. T. (2007): Contribuição ao estudo dos Proboscídea (Mammalia, Gomphotheriidae) do Quaternário do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Trabajo para optar por al grado de Máster en Geociencias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. pp. 113.

Gadens, G. T. (2008): Novas contribuições ao estudo dos Proboscídea (Mammalia, Gomphotheriidae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil-aspetos taxonómicos. *Revista de Ciências Biológicas*. 2: 65-83.

Gheerbrant, E. (2009): Paleocene emergence of elephant relatives and the rapid radiation of African ungulates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106: 10717-10721.

Gheerbrant, E., Bouya, B. y Amaghazaz, M. (2012): Dental and cranial anatomy of *Eritherium azouzor* from the Paleocene of Morocco, earliest known proboscidean mammal. *Palaeontographica Abteilung A: Palaeozoology-Stratigraphy*. 297: 151-183.

Gheerbrant, E., Sudre, J. y Cappetta, H. (1996): A Palaeocene proboscidean from Morocco. *Nature*. 383: 68-70.

Gheerbrant, E. y Tassy, P. (2009): L' origine et L' évolution des éléphants. *Comptes Rendus Palevol*. 8: 281-294.



Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Willerslev, E., Turner-Walker, G. y Collins, M. (2006): *International Journal of Osteoarchaeology*. 16: 156-164.

Gold, D. A., Robinson, J., Farrell, A. B., Harris, J. M., Thalmann, O. Y Jacobs, D. K. (2014): Attempted DNA extraction from a Rancho La Brea Columbian mammoth (*Mammuthus columbi*): prospects for ancient DNA from asphalt deposits. *Ecology and Evolution*. 4: 329-336.

Gómez, B. M. (2006): Revisión del registro fósil y distribución de los mastodontes (Proboscídea: Gomphotheriidae) del Cuaternario em Colombia. Trabajo para optar por al título de Biólogo, Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Medellín, Colombia. pp. 84.

González-Guarda, E., Domingo, L., Tornero, C., Pino, M., Hernández-Fernández, M., Sevilla, P., Villavicencio, N. y Agustí, J. (2017): Late Pleistocene ecological environmental and climatic reconstruction based on megafauna stable isotopes from northwestern Chilean Patagonia. *Quaternary Science Reviews*. 170: 188-202.

Graham, R. Wm. (2001): Late Quaternary biogeography and extinction of Proboscideans in North America. *The World of Elephants*, International Congress, Rome. 707-709.

Graur, D. y Li, H.-W. (2000): *Fundamentals of Molecular Evolution*, Second Edition. Sinauer Associates, Sunderland. pp. 481.



Hammer, Ø., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. (2001): PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologica Electronica*. 4: 9.

Hammer, Ø. Y Harper, D. A. T. (2006): Paleontological Data Analysis. Blackwell Publishing. pp. 351.

Harvey, V. L., Egerton, V. M., Chamberlain, A. T., Manning, P. L. y Buckley, M. (2016): Collagen Fingerprinting: A New Screening Technique for Radiocarbon Dating Ancient Bone. *PLoS ONE* 11(3): e0150650. doi:10.1371/journal.pone.0150650

Hay, O. P. (1922): Further observations on some extinct elephants. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 35: 97-102.

Haynes, G., (1991): Mammoths, Mastodons, and Elephants: Biology, Behavior, and the Fossil Record. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 413.

Hedges, R. E. M. (1983): 14-C dating by the accelerator technique. En: 14-C and chronology, 1st International Symposium, Groninga. (Eds.): Mook, W. G. y Waterbolk, H. T. pp. 165-175.

Hedges, R. E. M. y Millard, A. R. (1994): Bones and Groundwater: Towards the Modelling of Diagenetic Processes. *Journal of Archaeological Science*. 22: 155-164.



Hoffstetter, R. (1950): Observaciones sobre los mastodontes de Sud América y especialmente del Ecuador. *Hapломastodon*, subgn. nov. de *Stegomastodon*. *Publicaciones de la Escuela Politécnica Nacional*. 1: 1-51.

Hoffstetter, R. (1952): Les mammifères pléistocènes de la République de l'Équateur. *Mémoires, Société Géologique de France*. 66:1-391.

Hofreiter, M., Collins, M. y Stewart, J. R. (2012): Ancient biomolecules in Quaternary palaeoecology. *Quaternary Science Reviews*. 33: 1-13.

Illigeri, C. D. (1811): *Prodromus Systematis Mammalium et Avium*. Berolini, Sumptibus C. Salfeld. pp. 301.

Jiang, X., Ye, M., Jiang, X., Liu, G., Feng, S., Cui, L. y Zou, H. (2007): Method Development of Efficient Protein Extraction in Bone Tissue for Proteome Analysis. *Journal of Proteome Research*. 6: 2287-2294.

Jiménez-Hidalgo, E. Pérez-Cruz, L. A. (2014): Primer registro de *Cuvieronius* (Proboscidea: Gomphotheriidae) en el Pleistoceno del Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, sur de México, algunas consideraciones sobre su taxonomía y distribución geográfica en México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 31: 354-360.

Jones, A. M., O'Connell, T. C., Young, E. D., Scott, K., Buckingham, C. M., Iacumin, P. y Brasier, M. D. (2001): Biogeochemical data from well preserved 200Ka collagen and skeletal remains. *Earth and Planetary Science Letters*. 193: 143-149.



Jowsey, J. (1966): Studies of Haversian systems in man and some animals. *Journal of Anatomy*. 100: 857-664.

Kalb, J. E., Froehlich, D. J. y Bell, G. L. (1996): Palaeobiogeography of late Neogene African and Eurasian Elephantoidea. En: *The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives*. (Eds.): Shoshani, J. y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 117-123.

Kellog, M. E., Burkett, S., Dennis, T. R., Stone, G., Gray, B. A., McGuire, P. M., Zori, R. T. y Stanyon, R. (2007): Chromosome painting in the manatee supports Afrotheria and Paenungulata. *BMC Evolutionary Biology*. 7: 1-7.

Kendall, D. G. (1977): Diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*. 9: 428-430.

Kerley, E. R. (1965): The Microscopic Determination of Age in Human Bone. *American Journal of Physical Anthropology*. 23: 149-164.

Klingenberg, C. P. (2010): Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics*. 11: 623-635.

Klingenberg, C. P. (2011): MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. 11: 353-357.

Koolman, J. y Roehm, K.-H. (2005): *Color Atlas of Biochemistry*, Second edition. Thieme, Stuttgart, New York. pp. 467.



Labarca, R., Recabarren, O. P., Canales-Brellenthin, P. y Pino, M. (2014): The gomphotheres (proboscidea: Gomphotheriidae) from Pilauco site: Scavenging evidence in the Late Pleistocene of the Chilean Patagonia. *Quaternary International*. 352: 75-84.

Lambert, W. D. (1996): The biogeography of the gomphotheriid proboscideans of North America. En: *The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives*. (Eds.): Shoshani, J. y Tassy, P. Oxford University Press, Oxford. pp. 143-148.

Lambert, W. D. y Shoshani, J. (1998): Proboscidea. En: *Evolution of Tertiary Mammals of North America. Volume 1: Terrestrial Carnivores, Ungulates, and Ungulatelike Mammals*. (Eds.): Janis, C. M., Scott, K. M, y Jacobs, L. L. Cambridge University Press. pp. 606-621.

Larramendi, A. (2016): Shoulder height, body mass, and shape of proboscideans. *Acta Palaeontologica Polonica*. 61: 537-574.

Lehninger, A. L. (2009): *Principios de Bioquímica*, quinta edición. Ediciones Omega, Barcelona. pp. 1158.

Leigh, E. G., O'Dea, A. y Vermeij, G. J. (2014): Historical biogeography of the Isthmus of Panama. *Biological Reviews*. 89: 148-172.

Liebler, D. C. (2002): *Introduction to Proteomics, Tools for the New Biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 198.



Lister, A. M. (1996): Evolution and taxonomy of Eurasian mammoths. En: *The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives*. (Eds.): Shoshani, J. y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 203-213.

Liu, A. G. S., Seiffert, E. R. y Somons, E. L. (2008): Stable isotope evidence for an amphibious phase in early proboscidean evolution. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 5786-5791.

López-Galán, A. (2015): Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en biología. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 19: 53-59.

Lowenstein, J. M. y Scheuenstuhl, G. (1991): Immunological methods in molecular palaeontology. *Philosophical Transactions The Royal Society London B*. 333: 375-380.

Lucas, S. G. (2008a): *Cuvieronius* (Mammalia, Proboscidea) from the Neogene of Florida. *New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*. 44: 39-49.

Lucas, S. G. (2008b): Late Cenozoic fossil mammals from the Chapala rift basin, Jalisco, Mexico. *Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*. 44: 39-50.

Lucas, S. G. (2008c): Late Cenozoic vertebrate fossilassemblages from Jalisco, Mexico. *Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin*. 44: 51-64.

Lucas, S. G. (2013): The palaeobiogeography of South American gomphotheres. *Journal of Palaeogeography*. 2: 19-40.



Lucas S. G., Aguilar R. H. y Spielmann J. A. (2011): *Stegomastodon* (Mammalia, Proboscidea) from the Pliocene of Jalisco, Mexico and the species.level taxonomy of *Stegomastodon*. En: Fossil Record 3, vol. 53. (Eds.): Sullivan, R. M. Lucas, S. G. y Spielmann, J. A. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin. pp. 517-553.

Lucas, S. G. y Alvarado, G. E. (2010): Fossil proboscidea from the upper Cenozoic of Central America: taxonomy, evolutionary and paleobiogeographic significance. *Revista Geológica de América Central*. 42: 9 - 42.

Lucas, S. G. y Morgan, G. (2014): Description, classification, and geologic context of a Lower Pleistocene primitive mammoth jaw from Matanza Arroyo near Socorro, New Mexico. *New Mexico Geology*. 36: 48-58.

Lucas, S. G., Requena, J. E. y Alvarado, G. E. (2016): *Cuvieronius* (Mammalia, Proboscidea) del Pleistoceno de Chahal, Guatemala. *Revista Guatemalteca de Ciencias de la Tierra*. 3: 67-74.

Madden, C. T. (1980): The Proboscidea of South America. Geological Society of North America, Abstracts with Programs. 12: 474.

Maglio, V. J. (1973): Origin and evolution of the Elephantidae. *Transactions of The American Philosophical Society of Philadelphia, New Series*. 63: 1-149.



Marom, A., McCullagh, J. S. O., Higham, T. F. G., Sinitsyn, A. A. y Hedges, R. E. M. (2012): Single amino acid radiocarbon dating of Upper Paleolithic modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109: 6878-6881.

Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y Ahern, K. G. (2002): Bioquímica, tercera edición. Pearson Educación, Madrid. pp. 1335.

Martiniaková, M., Grosskopf, B., Vondráková, M. Omelka, R. y Fabiš, M. (2006): Differences in Femoral Compact Bone Tissue Microscopic Structure between Adult Cows (*Bos taurus*) and Pigs (*Sus scrofa domestica*). *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 35: 167-170.

Mason, M. W., Skedros, J. G. y Bloebaum, R. D. (1995): Evidence of Strain-Mode_Related Cortical Adaptation in the Diaphysis of the Horse Radius. *Bone*. 17: 229-237.

Mazo, A. V. (1996): Gomphotheres and mammutids from the Iberian Peninsula. En: *The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives*. (Eds.): Shoshani, J. y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 136-142.

McCullagh, J. S. O., Marom, A. y Hedges, R. E. M. (2010): Radiocarbon Dating of Individual Amino Acids from Archaeological Bone Collagen. *Radiocarbon*. 52: 620-634.



Meunier, P. J. (1973): Use of an image-analyzing computer for bone morphometry. En: Clinical aspects of metabolic bone disease. (Eds.): Frame, B., Parfitt, A. M. y Duncan, H. Excerpta Medica, Amsterdam. pp. 148-151.

Meunier, P. J. (1983): Histomorphometry of the skeleton. En: Bone and mineral research, Annual 1. (Eds.): Peck, W. A. Elsevier, Amsterdam. pp. 191-222.

Miller, W. E. (1990): A *Rhynchotherium* Skull and Mandible from Southeastern Arizona. *Brigham Young University Geology Studies*. 36: 57-67.

Miller, W., Drautz, D. I., Ratan, A., Pusey, B., Qi, J., Lesk, A. M., Tomsho, L. P., Packard, M. D., Zhao, F., Sher, A., Tikhonov, A., Reney, B., Patterson, N., Lindbland-Toh, K., Lander, E. S., Knight, J. R., Irzyk, G. P., Fredrikson, K. M., Harkins, T. T., Sheridan, S., Pringle, T. y Schuster, S. C. (2008): Sequencing the nuclear genome of the extinct woolly mammoth. *Nature*. 456: 387-392.

Montané, J. (1968): Primera fecha radiocarbónica de Tagua - Tagua. *Noticiario Mensual Museo Nacional de Historia Natural de Chile*. 139: 11.

Moreno, M. (2005): De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural*. 100: 45-65.

Morgan, G. S. y Lucas, S. G. (2011): *Stegomastodon* (Mammalia: Proboscidea: Gomphotheriidae) from The Blancan and Irvingtonian (Pliocene and early Pleistocene) of New Mexico. En: Fossil Record 3, vol. 53. (Eds.): Sullivan, R. M. Lucas, S. G. y Spielmann, J. A. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin. pp. 570-582.



Mothé, D. y Avilla, L. (2015): Mythbusting evolutionary issues on South American Gomphotheriidae (Mammalia: Proboscidea). *Quaternary Science Reviews*. 110: 23-35.

Mothé, D., Avilla, L. y Cozzuol, M. (2013): The South American gomphotheres (Mammalia, Proboscidea, Gomphotheriidae): Taxonomy, Phylogeny, and Biogeography. *Journal of Mammal Evolution*. 20: 23-32.

Mothé, D., Avilla, L., Cozzuol, M. y Winck, G. (2012): Taxonomic revision of the Quaternary gomphotheres (Mammalia: Proboscidea: Gomphotheriidae) from the South American lowlands. *Quaternary International*. 276-277: 2-7.

Mothé, D., dos Santos Avilla, L., Asevedo, L., Borges-Silva, L., Rosas, M., Labarca-Encina, R. Souberlich, R., Soibelson, E., Roman-Carrion, J. L., Ríos, S. D., Rincon, A. D., Cardoso de Olivera, G. y Pereira, R. (2017a): Sixty years after “The mastodonts of Brazil”: The estate of the art of South American proboscideans (Proboscidea, Gomphotheriidae). *Quaternary International*. 443: 52-64.

Mothé, D., Ferretti, M. P. y Avilla, L. S. (2016): The Dance of Tusks: Rediscovery of Lower Incisors in the Pan-American Proboscidean *Cuvieronius hyodon* Revises Incisor Evolution in Elephantimorpha. *PLoS ONE*. 11: e0147009. doi:10.1371/journal.pone.0147009

Mothé, D., Ferretti, M. P. y Avilla, L. S. (2017b): Running Over the Same Old Ground: *Stegomastodon* Never Roamed South America. *Journal of Mammalian Evolution*. DOI 10.1007/s10914-017-9392-y



Mulhern, D. M. y Ubelaker, D. H. (2003): Histologic Examination of Bone Development in Juvenile Chimpanzees. *American Journal of Physical Anthropology*. 122: 127-133.

Müller-Esterl, W. (2008): Bioquímica, fundamentos para Medicina y ciencias de la Vida. Editorial Reverté, Barcelona. pp. 657.

Nganvongpanit, K., Phatsara, M., Settakorn, J. y Mahakkanukrauh, P. (2015): Differences in compact bone tissue microscopic structure between adult humans (*Homo sapiens*) and Assam macaques (*Macaca assamensis*). *Forensic Science International*. 254: 243.e1-243.e5.

Olsen, S. J. (1959): Fossil Mammals of Florida. Tallahassee, Florida. pp. 75.

Osborn, H. F. (1923): New subfamily, generic, and specific stages in the evolution of the Proboscidea. *American Museum Novitates*. 99: 1-4.

Osborn, H. F. (1936): Proboscidea: A Monograph of the Discovery, Evolution, Migration and Extinction of the Mastodonts and Elephants of the World: Vol. I. Moeritherioidea, Deinotherioidea, Mastodontoidea. American Museum Press, New York. pp. 802.

Ostrom, P. H., Schall, M., Gandhi, H., Shen, T. L., Hauschka, P. V., Strahler, J. R. y Cage, D. A. (2000): New Strategies for characterizing ancient proteins using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 64: 1043-1050.



Ottoni, C., Koon, H. E., Collins, M. J. y Penkman, K. E. H. (2009): Preservation of ancient DNA in thermally damaged archaeological bone. *Naturwissenschaften*. 96: 267-278.

Owen, M. (1978): Histogenesis of bone cells. *Calcified Tissue Research*. 25: 205-207.

Parfitt, A. M., Drezner, M. K., Glorieux, F. H., Kanis, J. A., Malluche, H. Meunier, P. J., Ott, S. M. y Recker, R. R. (1987): Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2: 595-610.

Ozawa, T., Hayashi, S. y Mikhelson, V. M. (1997): Phylogenetic Position of Mammoth and Stellar's Sea Cow Within Tethytheria Demonstrated by Mitochondrial DNA Sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 44: 406-413.

Parodi, R. (1962): Los mastodontes sudamericanos y su clasificación. Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Ciencias Naturales, Cuaderno. pp. 41.

Parodi, R. (1987): Más sobre la clasificación de los mastodontes argentinos. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*. 4: 9-15.

Paula-Couto, de C. (1979): Tratado de Paleomastozoología. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. pp. 590.



Paunović, G., Bogićević, K. y Urošević, A. (2016): Mandible shape differentiation between *Mammuthus trogontherii* and *M. primigenius* and mandible shape ontogeny in *M. primigenius* specimens from Serbia: A preliminary explorative geometric morphometric study. *Quaternary International*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.quaint.2016.07.048>

Perea, D. y Alberdi, M. T. (2015): Los gonfotéridos (Mammalia, Proboscidea) de Uruguay: taxonomía, estratigrafía y cronología. *Estudios Geológicos*. 71, e036.

Pfeiffer, S. y Pinto, D. (2012): Histological Analyses of Human Bone from Archaeological Contexts. En: *Bone Histology an Anthropological Perspective*. (Eds.): Crowder, C. y Stout, S. CRC Press. pp. 297-311.

Pohlig, H. (1912): Sur une vieille mandibule de *Tetracaulodon ohioticum* Blum., avec défense in situ. *Bull. Soc. Belge Géol*. 26: 187-193.

Prado, J. L. y Alberdi, M. T. (2008): A cladistic analysis among trilophodont gomphotheres (Mammalia, Proboscidea) with special attention to the South American genera. *Palaeontology*. 51: 903-915.

Prado, J. L., Alberdi, M. T., Azanza, B., Sánchez, B. y Frassinetti, D. (2005): The Pleistocene Gomphotheriidae (Proboscidea) from South America. *Quaternary International*. 126-128: 21-30.



Prado, J. L., Alberdi, M. T. y Gómez, G. (2002): Late Pleistocene gomphotheres (Proboscidea) from the Arroyo Tapalque locality (Buenos Aires, Argentina) and their taxonomic and biogeographic implications. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie, Abhandlungen*. 225: 275-296

Prado, J. L., Alberdi, M. T., Sánchez, B. y Azanza, B. (2003): Diversity of the Pleistocene Gomphotheres (Gomphotheriidae, Proboscidea) from South America. En: *Advances in Mammoth Research*. (Eds.): Reumer, J. W. F., De Vos, J. y Mol, D. *Proceedings of the Second International Mammoth Conference*, Rotterdam. DEINSEA 9.

Prothero, D. R., y Schoch, R. (1989): Origin and evolution of the Perissodactyla: Summary and synthesis. En: *The Evolution of Perissodactyls*. (Eds.): Prothero y R. Schoch. Oxford University Press, New York. pp. 504–529.

Prothero, D. (2017): *The Princeton Field Guide to Prehistoric Mammals*. Princeton University Press. pp. 240.

Porter, C. A., Goodman, M. y Stanhope, M. J. (1996): Evidence on Mammalian Phylogeny from Sequences of Exon 28 of the von Willebrand Factor Gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 5 : 89-101.

Recabarren, O. (2008): El gonfoterio de Pilauco. En: *Pilauco: un sitio complejo del Pleistoceno tardío. Osorno, Norpatagonia chilena*. (Ed.): M. Pino. Universidad Austral de Chile. pp. 148-150. Láminas 59-66.



Recabarren, O. P. (2019): The proboscidean gomphotheres (Mammalia, Gomphotheriidae) from southernmost South America. En: Pilauco: A Late Pleistocene Archaeo-paleontological Site, Osorno, Northwestern Patagonia and Chile. (Eds.): Pino, M y Astoga, G. Springer. doi: 10.1007/978-3-030-23918-3_4

Recabarren, O. P, Pino, M. y Alberdi, M. T. (2014): La familia Gomphotheriidae en América del Sur: evidencia de molares al norte de la Patagonia chilena. *Estudios Geológicos*. 70: e001.

Recker, R. R. (1983): Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 306.

Robey, P. G. y Boskey, A. L. (1996): The biochemistry of bone. En: Osteoporosis. (Eds.): Marcus, R., Feldman, D. y Kelsey, J. Academic Press, San Diego, CA. 95-183.

Reed, F. S. y Mergner, J. L. (1953): Preparation of Rock Thin Sections. *American Mineralogist*. 38: 1184-1203.

Roca, A. L. y O'Brien, S. J. (2005): Genomic inferences from Afrotheria and the evolution of elephants. *Current Opinion in Genetics & Development*. 15: 652-659.

Rohland, N. y Hofreiter, M. (2007): Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*. 7: 1756-1762.



Rohland, N., Malaspinas, A-S., Pollack, J. L., Slatkin, M., Matheus, P. y Hofreiter, M. (2007): Proboscidean Mitogenomics: Chronology and Mode of Elephant Evolution Using Mastodon as Outgroup. *PLOS Biology*. 5: 1663-1671.

Rohlf, F. J. y Marcus, L. F. (1993): A Revolution in Morphometris. *Tree*. 8: 129-132.

Rohlf, F. J. (1998): Geometric Morphometrics and Phylogeny. *Systematic Biology*. 47: 147-158.

Rohlf, F. J. (1999): Shape Statistics: Procrustes Superimpositions and Tangent Spaces. *Journal of Classification*. 16: 197-223.

Rohlf, F. J. (2015): The tps series of software. *Hystrix, the italian Journal of Mammalogy*. doi:10.4404/hystrix-26.1-11264

Rohlf, F. J. (2017a): TpsDig 2.31. Departmento of Ecology & Evolution and Anthropology. State University of New York, Stony Brook, New York.

Rohlf, F. J. (2017b): TpsRelw 1.69. Departmento of Ecology & Evolution and Anthropology. State University of New York, Stony Brook, New York.

Rohlf, F. J. (2018): TpsUtil 1.76. Departmento of Ecology & Evolution and Anthropology. State University of New York, Stony Brook, New York.



Rybczynski, N., Gosse, J. C., Harington, C. R., Wogelius, R. A., Hidy, A. J. y Buckley M. (2013): Mid-Pliocene warm-period deposits in the High Arctic yield insight into camel evolution. *Nature communications*. 4: 1550. doi: 10.1038/ncomms2516 PMID: 23462993

Sanders, W. J., Gheerbrant, E., Harris, J. M., Saegusa, H. y Delmer, C. (2010): Proboscidea. En: *Cenozoic Mammals of Africa*. (Eds.): Werdelin, L. y Sanders, W. University of California Press. pp. 161-251

Santos, F. J., Gómez-Martínez, I., y García-León, M. (2010): Radiocarbon dating of medieval manuscripts from the University of Seville. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 268: 1038-1040.

Schaedler, J. M., Krook, L., Wootton, J. A. M. Hover, B., Brodsky, B., Naresh, M. D. Gillette, D. D., Madsen, D. B., Horne, R. H. y Minor, R. R. (1992): Studies of Collagen in Bone and Dentin Matrix of a Columbian Mammoth (Late Pleistocene) of Central Utah. *Matrix*. 12: 297-307.

Schenk, R. K., Merz, W. A., Muller, J. A. (1969): A quantitative histological study of bone resorption in human cancellous bone. *Acta Anatomica*. 74: 44-53.

Schervish, M. J. (1996): *P Values: What They Are and What They Are Not*. *The American Statistician*. 50: 203-206.



Schweitzer, M. H., Hill, C. L., Pincus, S. H., Asara, J. M. y Lane, W. S. (2002): Identification of Immunoreactive Material in Mammoth Fossils. *Journal of Molecular Evolution*. 55: 696-705.

Shoshani, J. (1998): Understanding proboscidean evolution: a formidable task. *Trends in Ecology and Evolution*. 12: 480-487.

Shoshani, J., Kupsky, W. J. y Marchant, G. H. (2006): Elephant brain. Part I: Gross morphology, functions, comparative anatomy, and evolution. *Brain Research Bulletin*. 70: 124-157.

Shoshani, J., Lowenstein, J. M., Walz, D. A. y Goodman, M. (1985): Proboscidean origins of mastodon and woolly mammoth demonstrated immunologically. *Paleobiology*. 11: 429-437.

Shoshani, J. y Tassy, P. (1996): The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives. Oxford University Press. pp. 472.

Shoshani, J., West, R. M., Court, N., Savage, R. J. G. y Harris, J. M. (1996): The earliest proboscideans: general plan, taxonomy, and palaeoecology. En: The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives. (Eds.): Shoshani, J. y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 57-75.

Shoulders, M. D., y Raines, R. T. (2009): Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*. 78: 929-958.



Simpson, G. G. (1985): Fósiles e historia de la vida. Scientific American, Ed. Labor, Barcelona. 240 p.

Simpson, G. G. (1945): The principles of classification and a classification of mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 85: 1-350.

Simpson, G. G. y Paula - Couto, C. (1957): The mastodonts of Brazil. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 2: 125-190.

Skedros, J. G., Hunt, K. J. y Bloebaum, D. (2004): Relationships of Loading History and Structural and Material Characteristics of Bone: Development of the Mule Deer Calcaneus. *Journal of Morphology*. 259: 281-307.

Skedros, J. G., Mason, M. W. y Bloebaum, R. D. (1994): Differences in Osteonal Micromorphology Between Tensile and Compressive Cortices of a Bending Skeletal System: Indications of Potential Strain-Specific Differences in Bone Microstructure. *The Anatomical Record*. 239: 405-413.

Skedros, J. G., Su, S. C. y Bloebaum, R. D. (1997): Biomechanical Implications of Mineral Content and Microstructural Variations in Cortical Bone of Horse, Elk, and Sheep Calcanei. *The Anatomical Record*. 249: 297-316.

Sommerfeldt, D. W. y Rubin, C. T. (2001): Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*. 10: S86-S95.



Stanhope, M. J., Madsen, O. Waddell, V. G., Cleven, G. C., de Jong, W. W. y Springer, M. S. (1998a): Highly Congruent Molecular Support for a Diverse Superordinal Clade of Endemic African Mammals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9: 501-508.

Stanhope, M. J., Waddell, V. G., Madsen, O., de Jon, W., Hedges, B., Cleven, G. C., Kao, D. y Springer, M. S. (1998b): Molecular evidence for multiple origins of Insectivora and for a new order of endemic African insectivore mammals. *Proceeding of the National Academy of Science*. 95: 9967-9972.

Steen, H. y Mann, M. (2004): The abc's (ans xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5: 699-711.

Stout, S. D., Brunsden, B. S., Hildebolt, C. F., Commean, P. K., Smith, K. E. y Tappen, N. C. (1999): Computer-assisted 3D reconstruction of serial sections of cortical bone to determine the 3D structure of osteons. *Calcified Tissue International*. 65: 280-284.

Stout, S. y Crowder, C. (2012): Bone Remodeling, Histomorphology, and Histomorphometry. En: Bone Histology And Anthropological Perspective. (Eds.): Crowder, C. y Stout, S. CRC Press. pp. 1-21.

Straehl, F. R., Scheyer, T. M., Forasiepi, A. M., MacPhee, R. D. y Sánchez-Villagra, M. R. (2013): PLoS ONE. e69275. doi:10.1371/journal.pone.0069275



Straulino, L., Mainou, L., Pi, T., Sedov, S., López-Corral, A., Santacruz-Cano, R. y Vicencio-Castellanos, A. G. (2019): Approach to the knowledge of preservation of pleistocenic bone: The case of a Gomphothere cranium from the site of Tepeticpac, Tlaxcala, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 36: 170-182.

Sukumar, R. (2003): The Living Elephants: Evolutionary Ecology, Behavior, and Conservation. *Oxford University Press*. pp 478.

Svartman, M. y Stanyon, R. (2012): The Chromosomes of Afrotheria and Their Bearing on Mammalian Genome Evolution. *Cytogenetic and Genome Research*. 137: 144-153.

Tabuce, R., Delmer, C. y Gheerbrant, E. (2007): Evolution of the tooth enamel microstructure in the earliest proboscideans (Mammalia). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 149: 611-628.

Tapia-Ramírez, G., Guzmán, A. F. y Polaco, O. J. (2013): Los gonfoterios (Proboscidea, Gomphotheriidae) de Colima, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 65: 591-607.

Tassy, P. (1986): Nouveaux Elephantoidea (Mammalia) Dans le Miocène du Kenya. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. pp. 230.

Tassy, P. (1996): The earliest gomphotheres. En: The Proboscidea. Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives. (Eds.): Shoshani, J y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 89-91.



Tassy P. (2014): L'odontologie de *Gomphotherium angustidens* (Cuvier, 1817) (Proboscidea, Mammalia): données issues du gisement d'En Pélouan (Miocène moyen du Gers, France). *Geodiversitas* 36 (1): 35-115.
<http://dx.doi.org/10.5252/g2014n1a2>

Tassy, P y Shoshani, J. (1996): Historical overview of classification and phylogeny of the Proboscidea. En: The Proboscidea. Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives. (Eds.): Shoshani, J y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 3-8.

Tedford, R. H., Skinner, M. F., Fields, R. W., Rensberger, J. M., Whistler, D. P., Galusha, T. Taylor, B. E., Macdonald, B. E. y Webb, S. D. (1987): Faunal succession and biochronology of the Arikareean through Hemphillian interval (late Oligocene through earliest Pliocene epochs) in North America. En: Cenozoic Mammals of North America. (Ed.): Woodburne, M. O. University of California Press, Berkeley. pp. 153-210.

Tobien, H. (1996): Evolution of zygodons with emphasis on dentition. En: The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives. (Eds.): Shoshani, J. y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 76-85.

Todd, N. E. y Roth, L. (1996): Origin and radiation of the Elephantidae. En: The Proboscidea: Evolution and Palaeoecology of Elephants and Their Relatives. (Eds.): Shoshani, J. y Tassy, P. Oxford University Press. pp. 193-202.



Torben, S. y Hauge, E. M. (2002): Normal Structure and Function of Bone. En: Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. (Eds.): An, Y. H. y Martin, K. L. Humana Press. pp. 59-72.

Torcida, S. y Perez, S. I. (2012): Análisis de Procrustes y el estudio de la variación morfológica. *Revista Argentina de Antropología Biológica*. 14: 131-141.

Toro, I. M. V., Manriquez, S. G. y Suazo, G. I. (2010): Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology*. 28: 977-990.

Tucker, M. E. (1988): Techniques in sedimentology. Blackwell Science, London. 394 p.

Trueman, C. N. G., Behrensmeyer, A. K., Tuross, N. y Weiner, S. (2004): Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Maboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *Journal of Archaeological Science*. 31: 721-739.

Urbanová, P. y Novotný, V. (2005): Distinguishing between human and non-human bones: histometric method for forensic anthropology. *Abthropologie*. 43: 77-85.

van der Molen, S., Martínez, N. A. y González-José, R. (2007): Introducción a la Morfometría Geométrica. Centro Nacional Patagónico and University of Barcelona. pp. 89.



van der Sluis, L. G., Hollund, H. I., Buckley, M., De Louw, P. G. B., Rijdsdijk, K. F. Y Kars, H. (2014): Combining histology, stable isotope analysis and ZooMS collagen fingerprinting to investigate the taphonomic history and dietary behaviour of extinct giant tortoises from the Mre aux Songes deposit on Mauritius. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 416: 80-91.

Viguet-Carrin, S., Garnero, P. y Delmas, P. D. (2006): The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis international*. 17: 319-336.

Waggoner, B. (2001): Molecular Palaeontology. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi: 10.1038/npg.els.0001627

Walsh, W. R., Walton, M., Bruce, W., Yu, Y., Gillies, R. M. y Svehla, M. (2003): Cell Structure and Biology of Bone and Cartilage. En: Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. (Eds.): An, Y. H. y Martin, K. L. Humana Press. pp. 35-58.

White, C. D. y Pchwarcz, H. P. (1989): Ancient Maya Diet: as Inferred from Isotopic and Elemental Analysis of Human Bone. *Journal of Archaeological Science*. 16: 451-474.

White, C. D., Healy, P. F. y Schwarcz, H. P. (1993): Intensive agriculture, social status, and Maya diet at Pacbitun, Belize. *Journal of Anthropological Research*. 49: 347-375.



Yang, H. (1997): Ancient DNA from Pleistocene fossils: preservation, recovery, and utility of ancient genetic information for Quaternary research. *Quaternary Science Reviews*. 16: 1145-1161.

Young, B. y Heath, J. W. (2001): Wheater's Histología funcional. Harcourt. pp. 413.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. y Fink, W. L. (2004): Geometric Morphometrics for Biologists: A primer. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press. pp. 443.



10.1 Anexo I

Figura A.I.1- Espectro de la muestra 267A

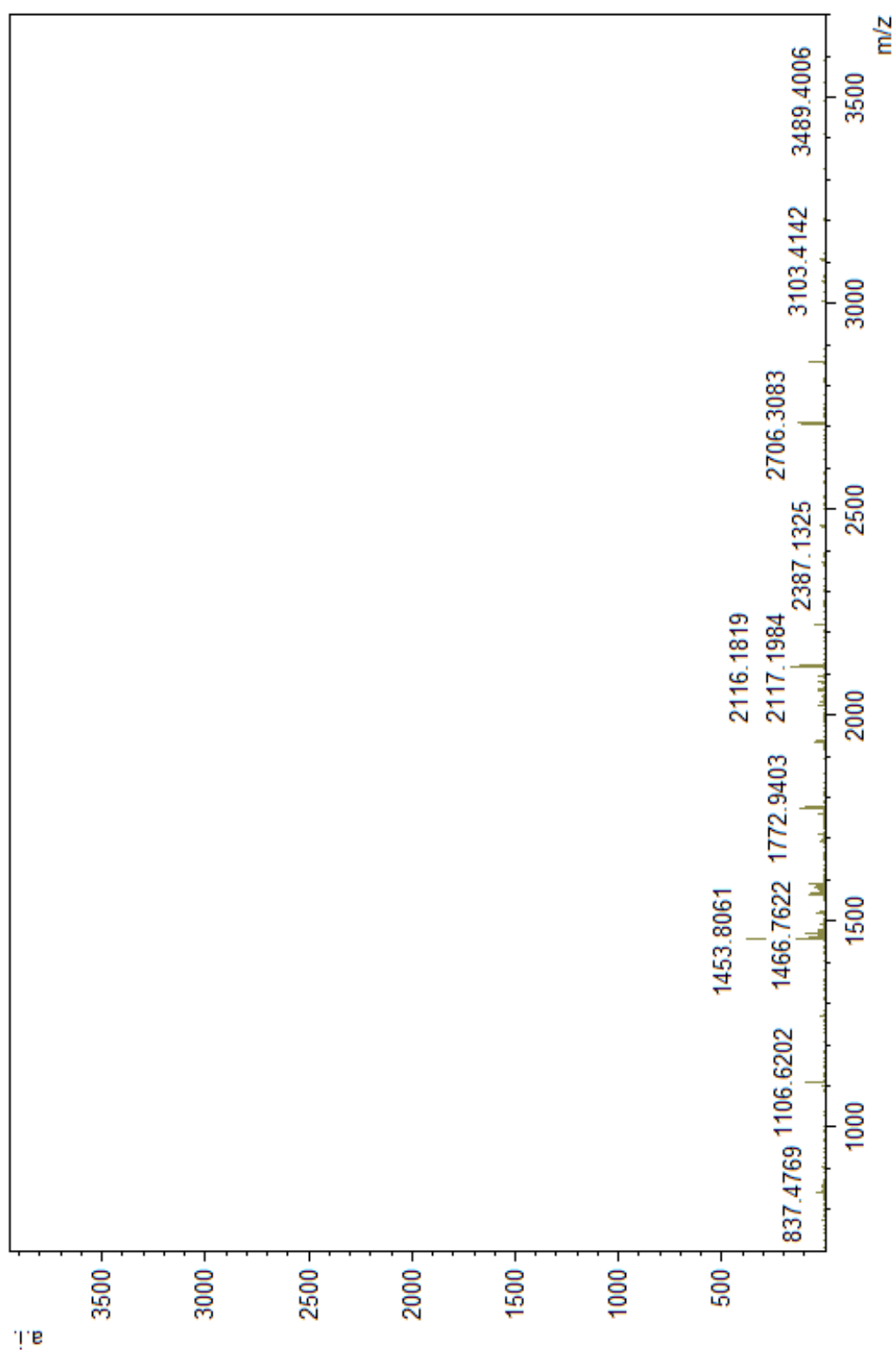


Figura A.I.2- Espectro de la muestra A02147

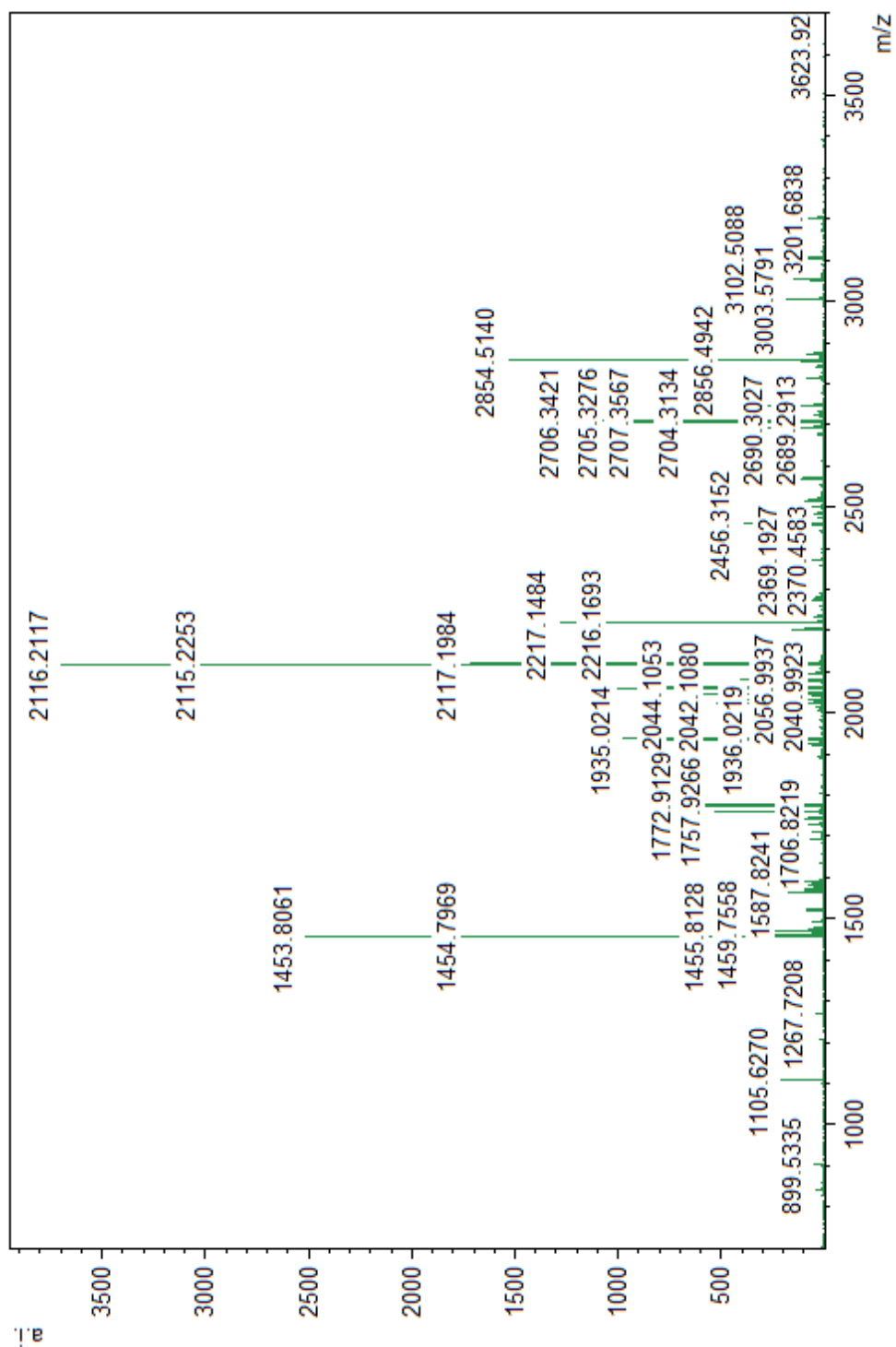


Figura A.I.3- Espectro de la muestra GEOUACH126

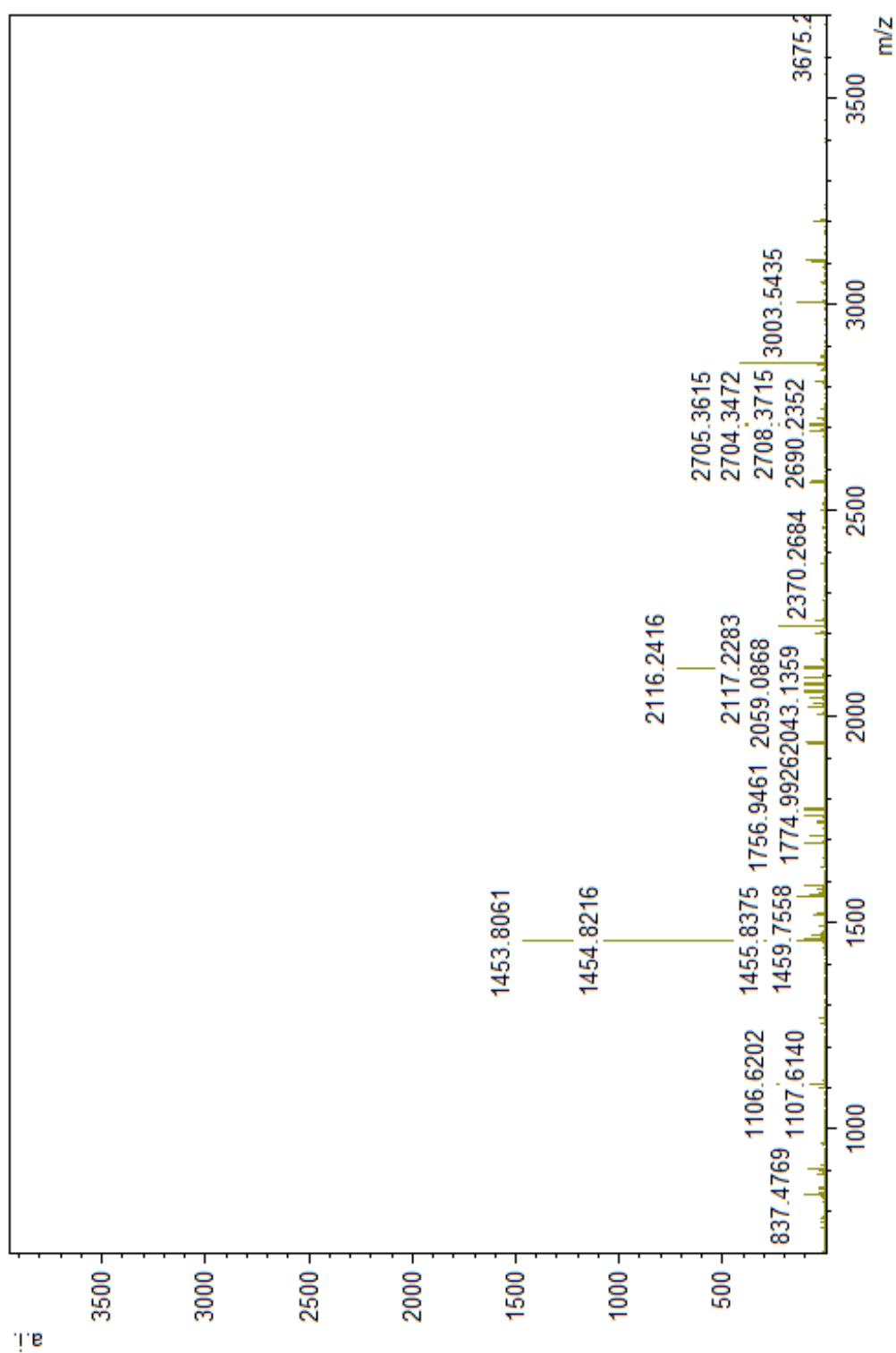




Figura A.I.4- Espectro de la muestra MHMOP/LB/13

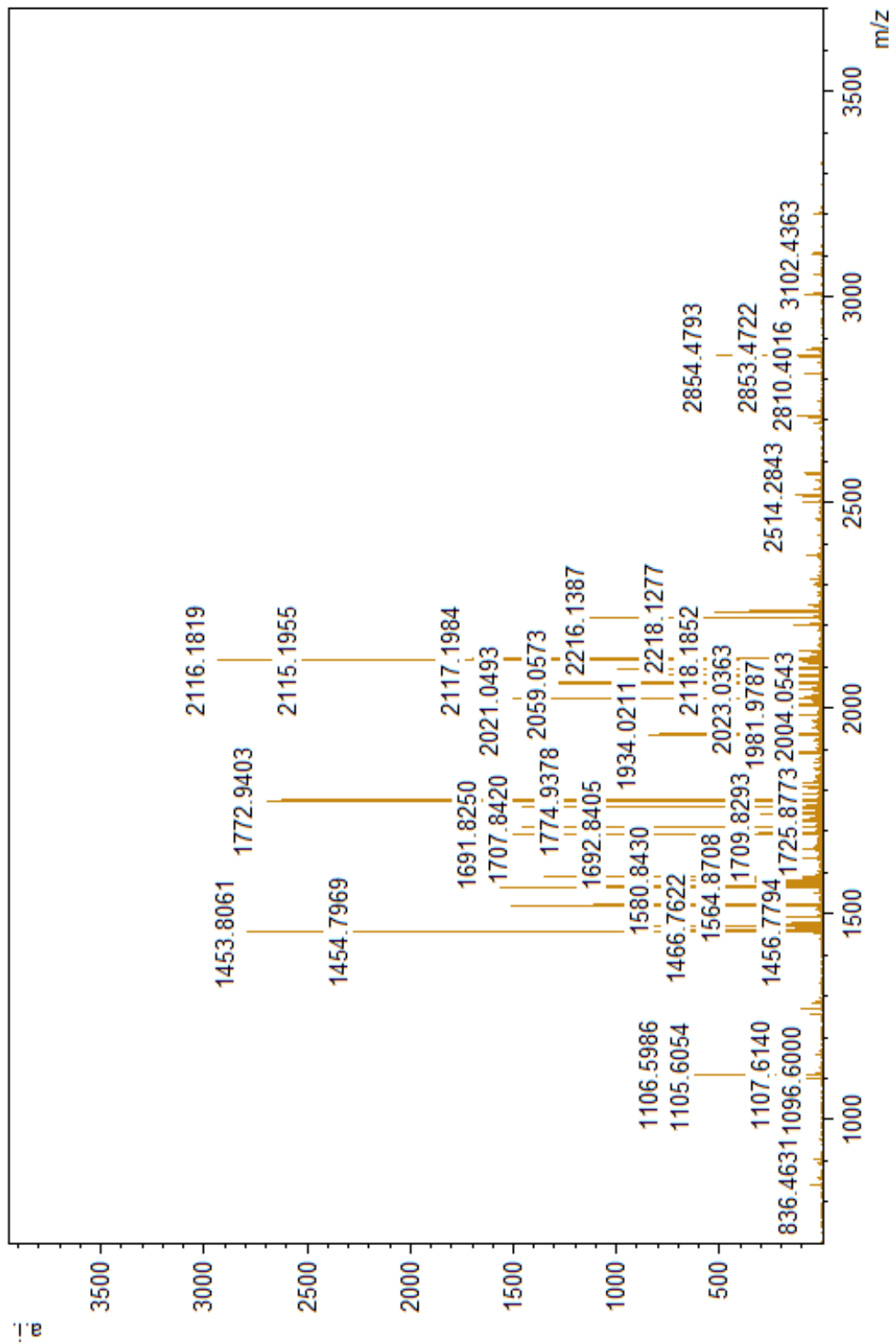


Figura A.I.5- Espectro de la muestra MMC5

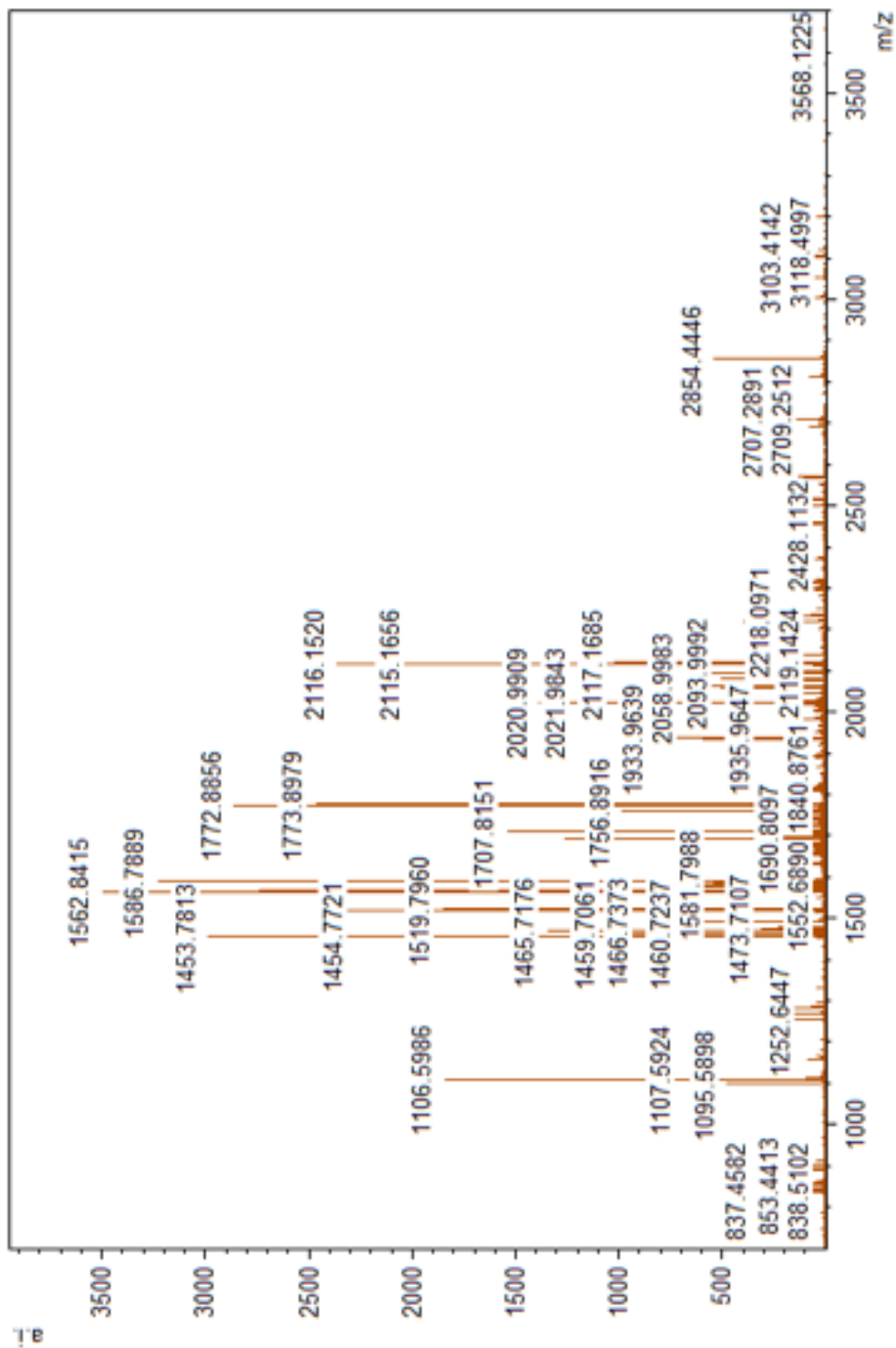


Figura A.I.6- Espectro de la muestra MRAZ462

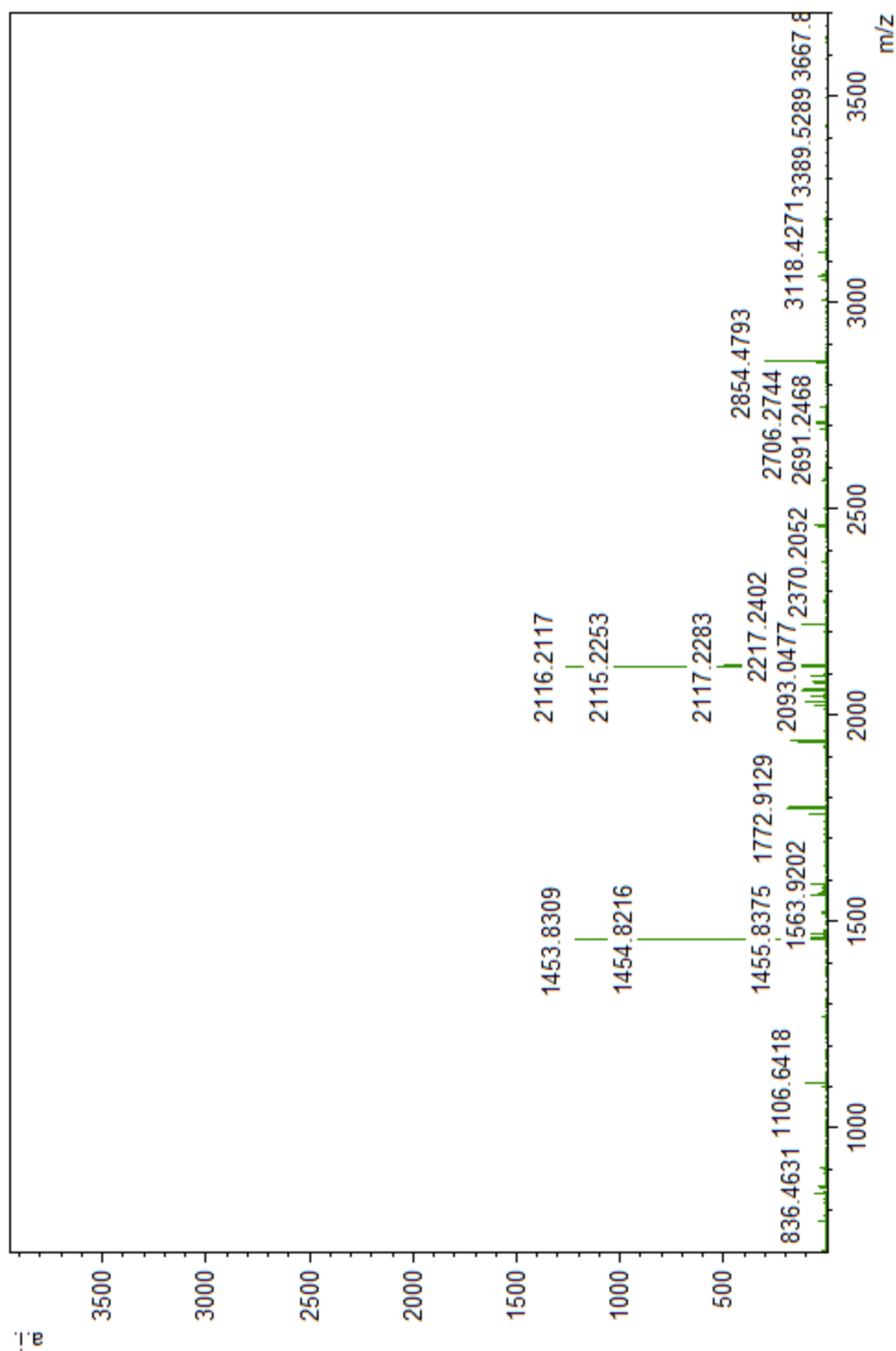


Figura A.I.7- Espectro de la muestra SGO-PV-43

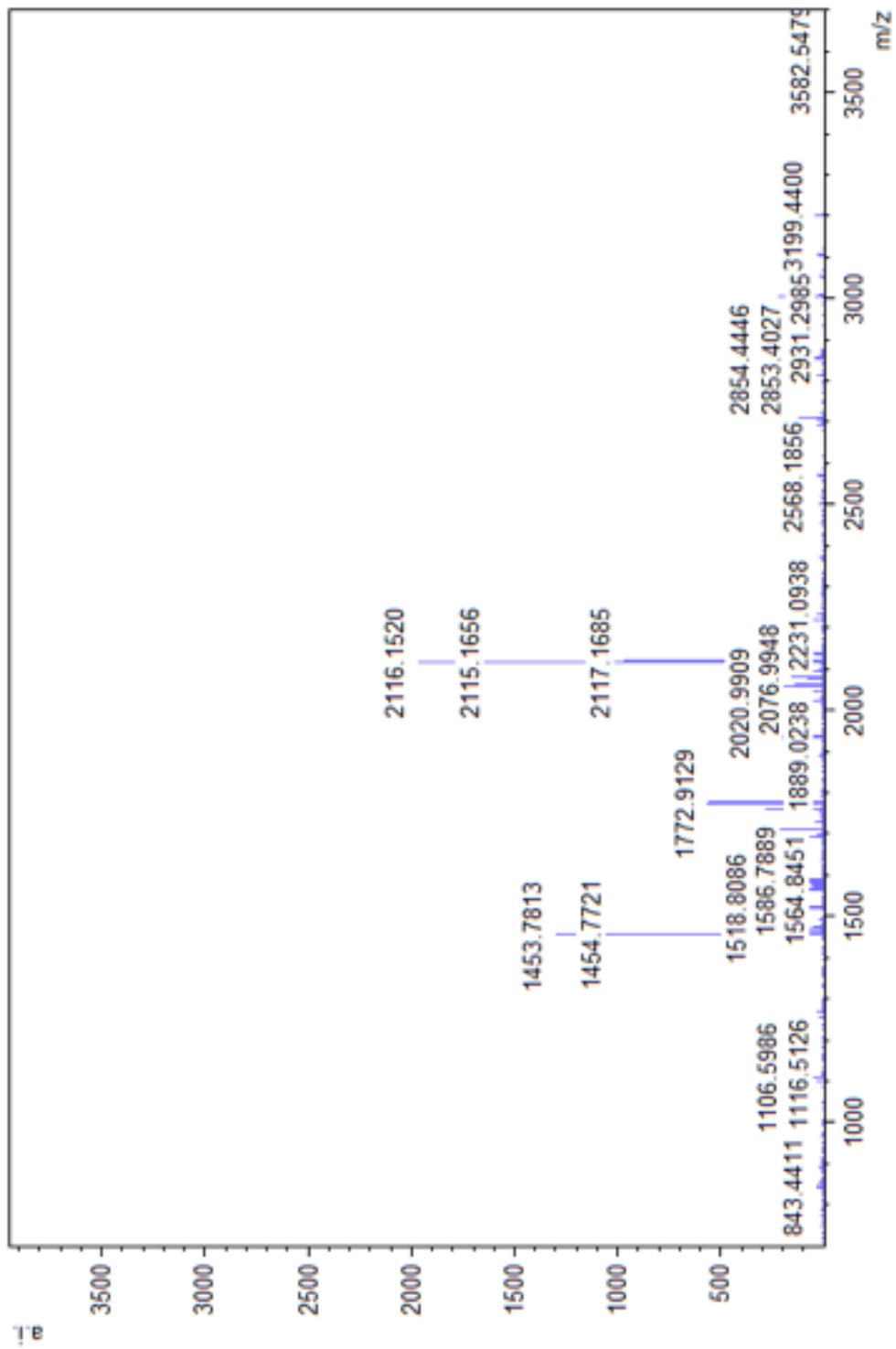


Figura A.I.8- Espectro de la muestra SGO-PV-47C

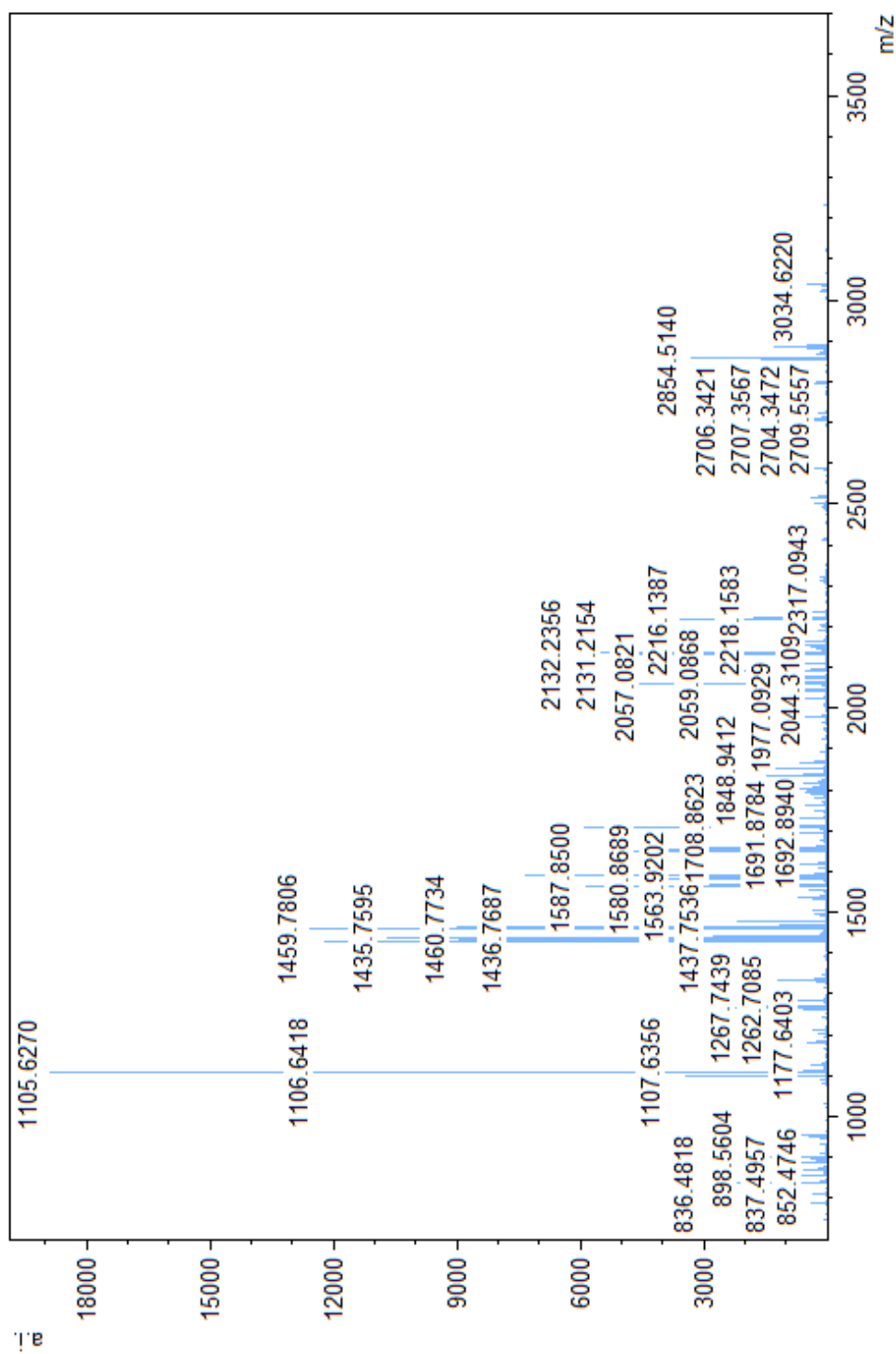


Figura A.I.9- Espectro de la muestra SGO-PV-47K

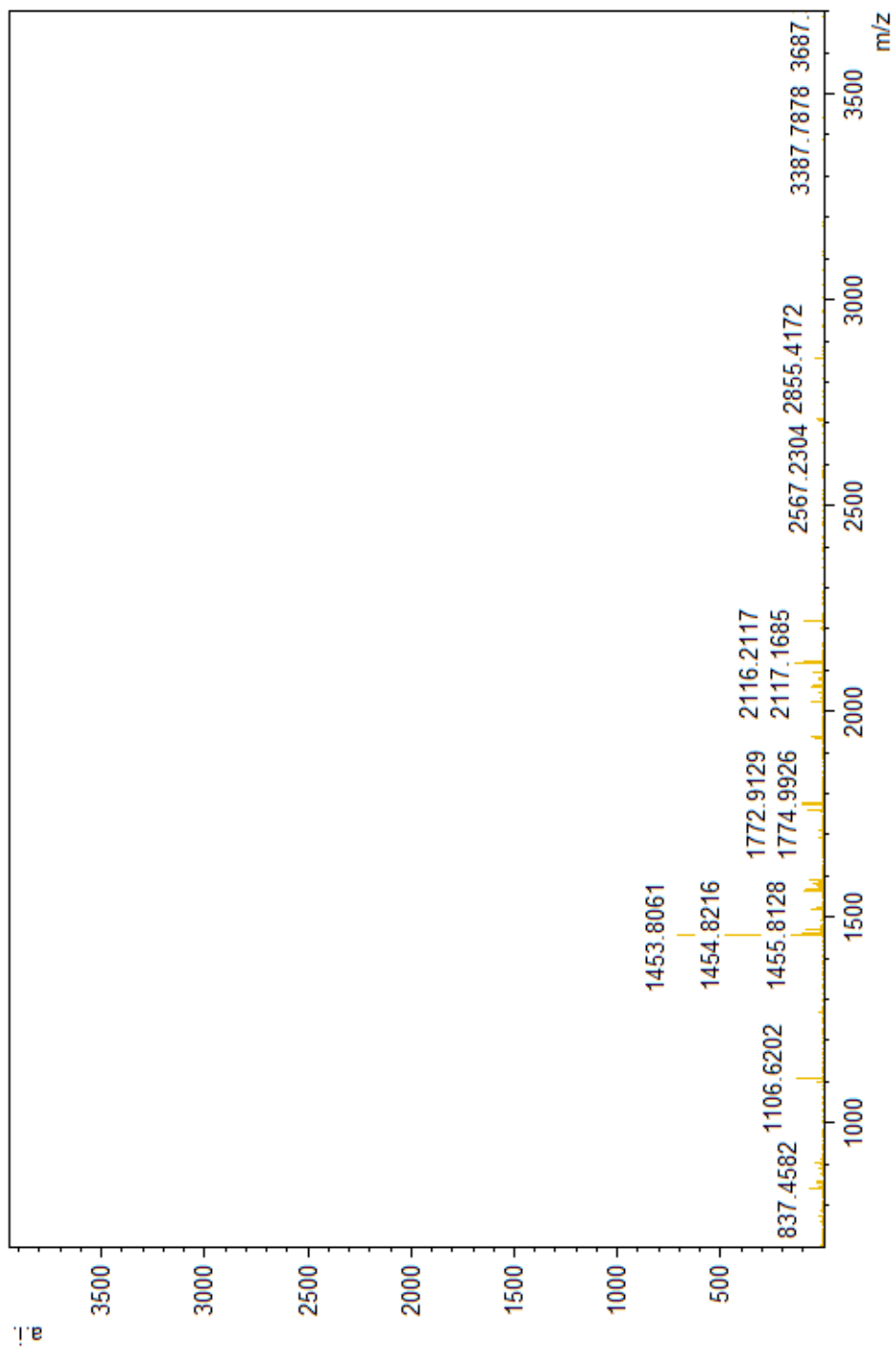
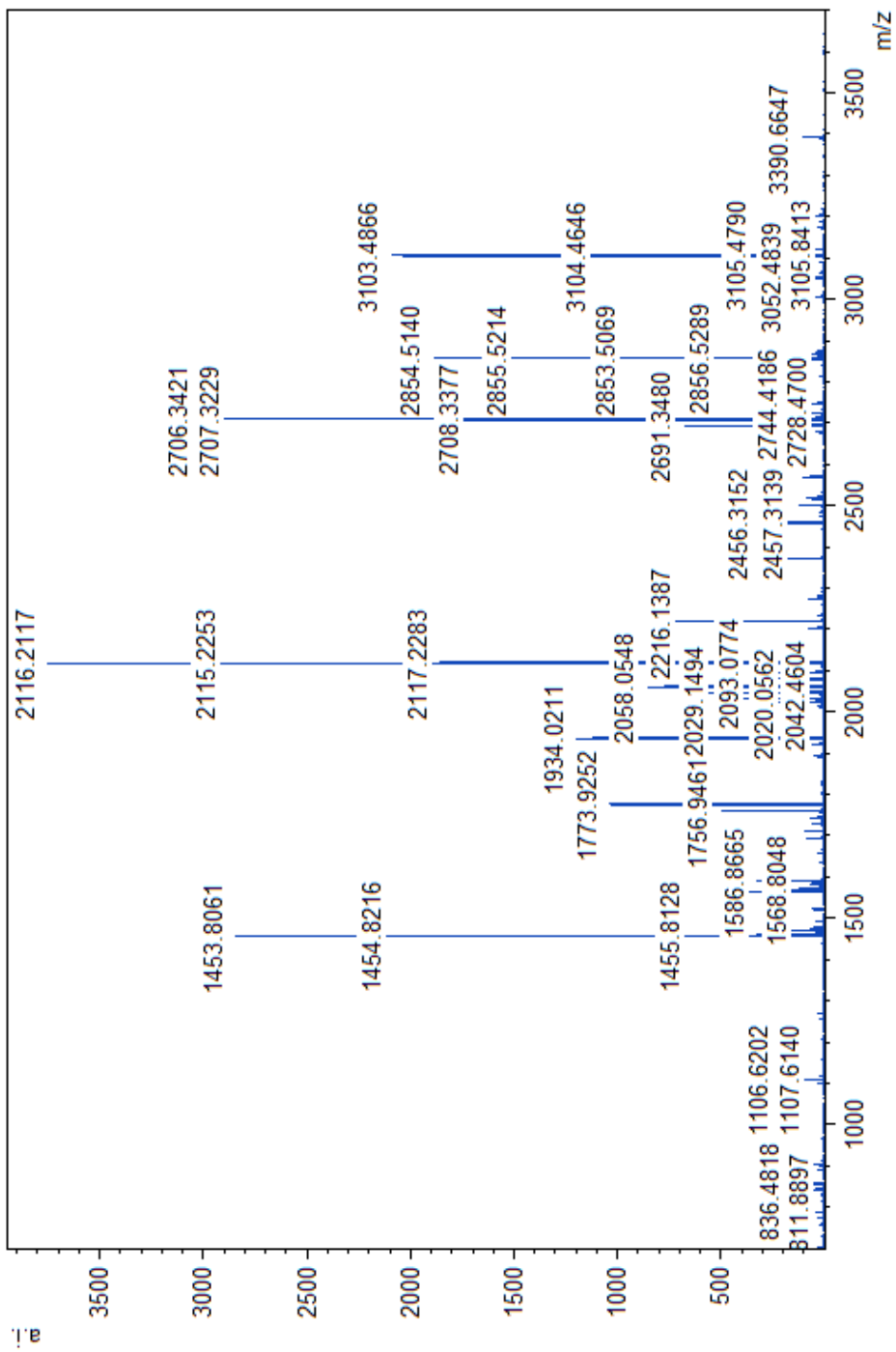




Figura A.I.10- Espectro de la muestra UACH.PV.LP.14





10.2- Anexo II

No fue posible unir las fotografías de Costa Rica (G-24NC), ni dos de Chile, muestra s/n y UACH.PV.TR.19. Todas las fotografías fueron ensambladas de fotografías tomadas a X4.

Muestras de Chile:

Figura A.II.1- Muestra MUSA 1637

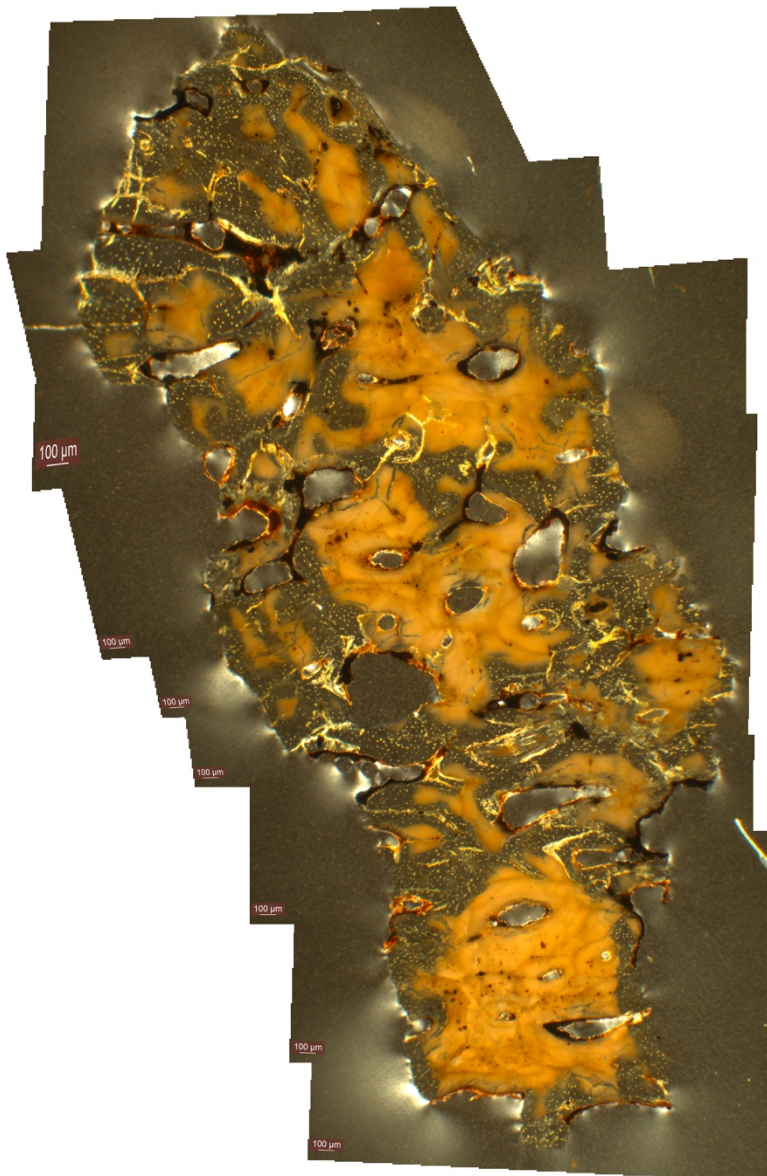


Figura A.II.2- Muestra SGO-11

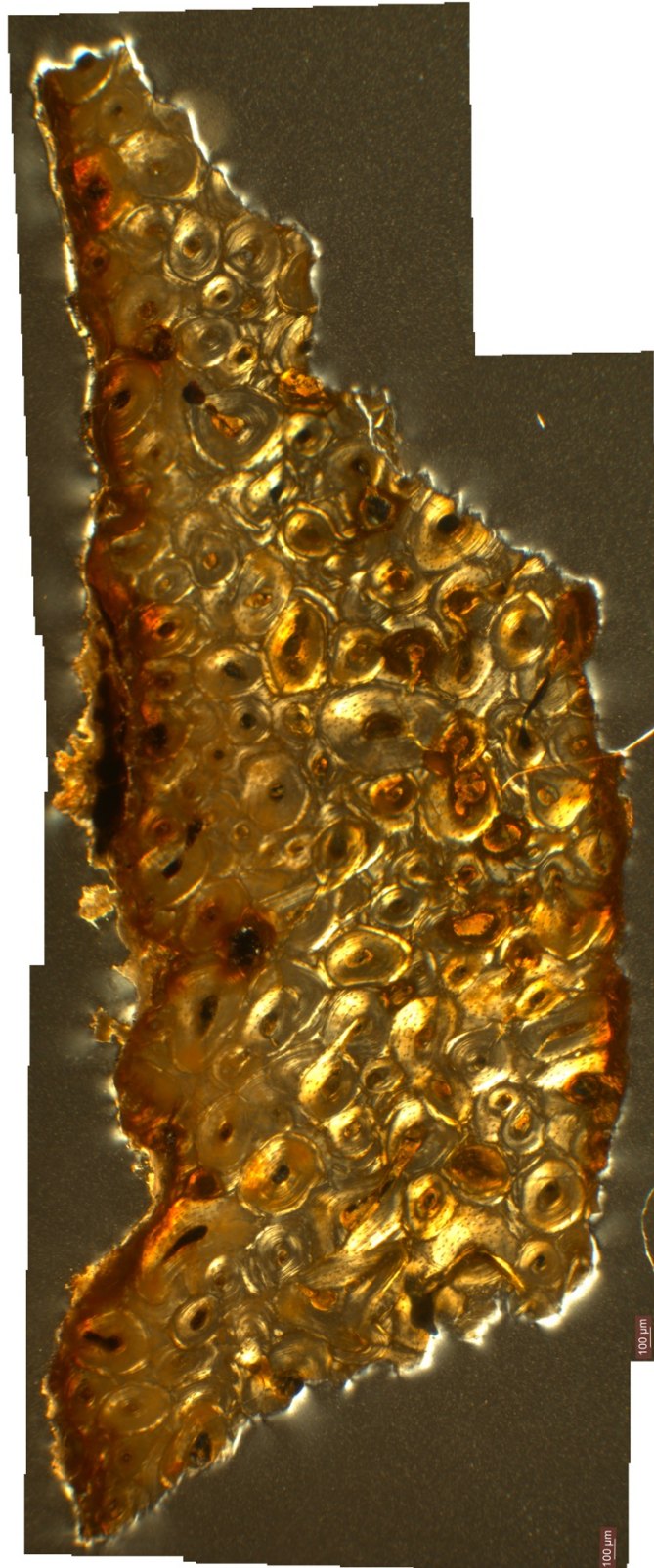


Figura A.II.3- Muestra SGO-244C

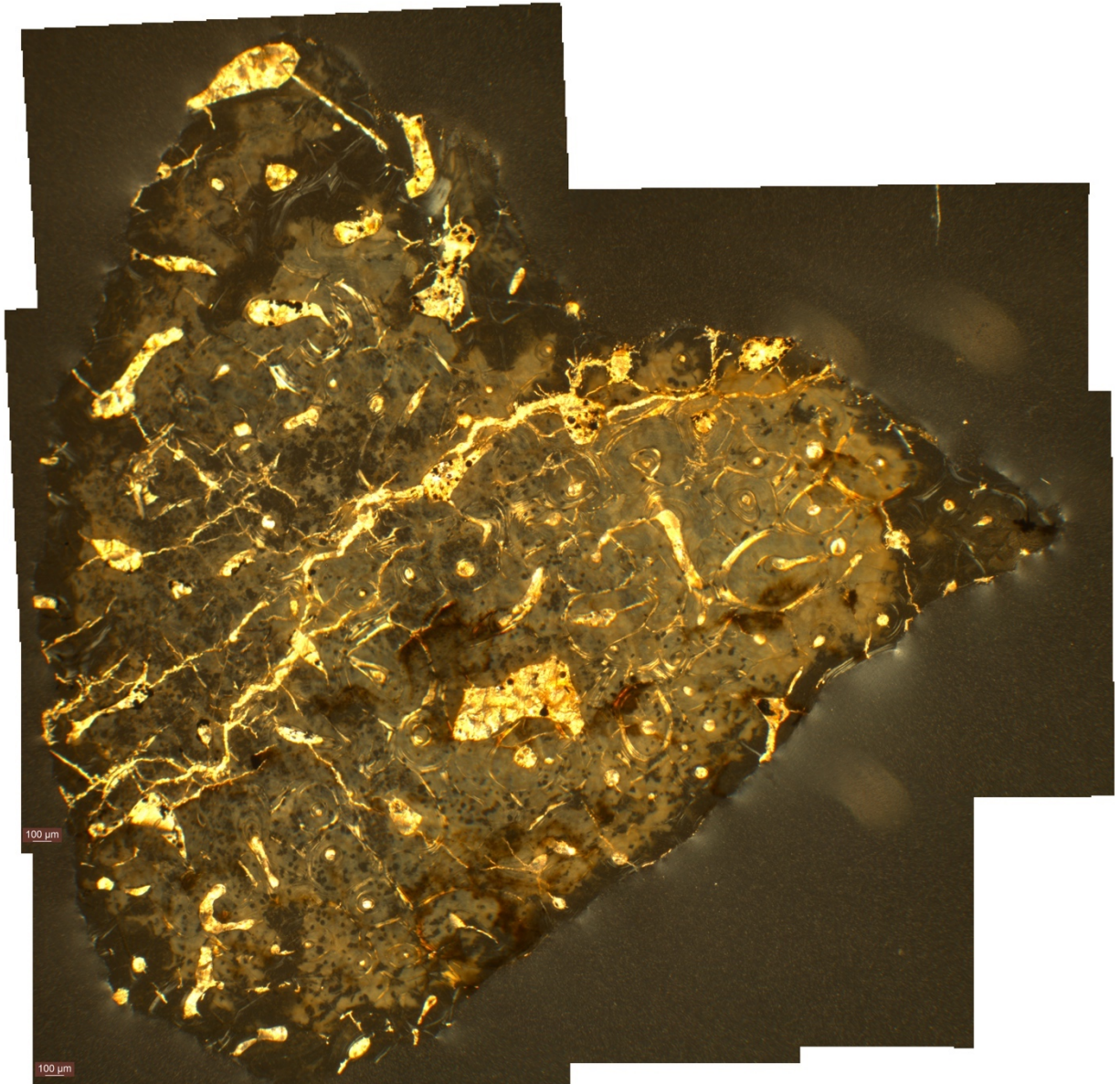


Figura A.II.4- Muestra GEOUACH126



Muestras de El Salvador:

Figura A.II.5- Muestra 70-1164

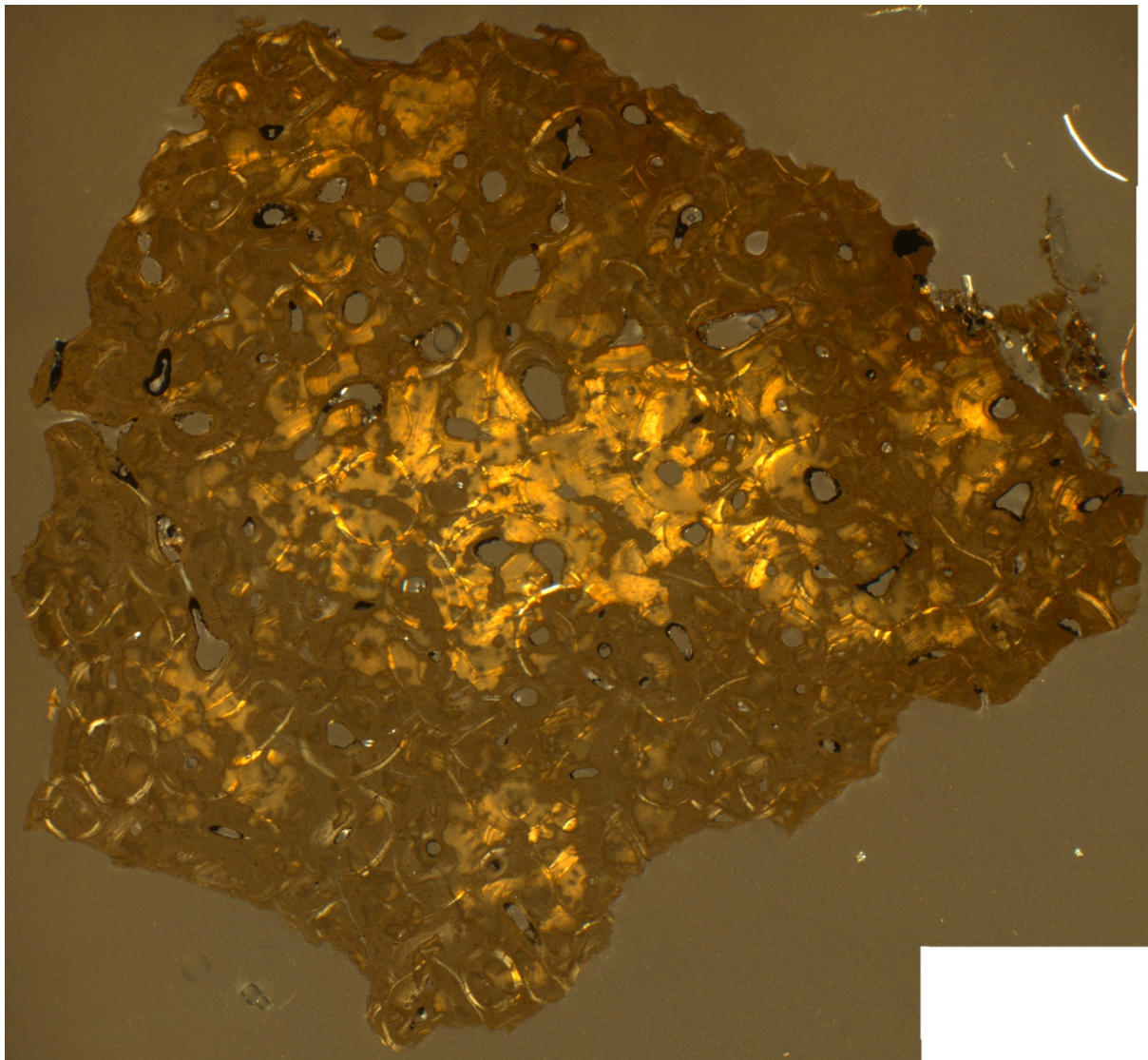


Figura A.II.6- Muestra 1169

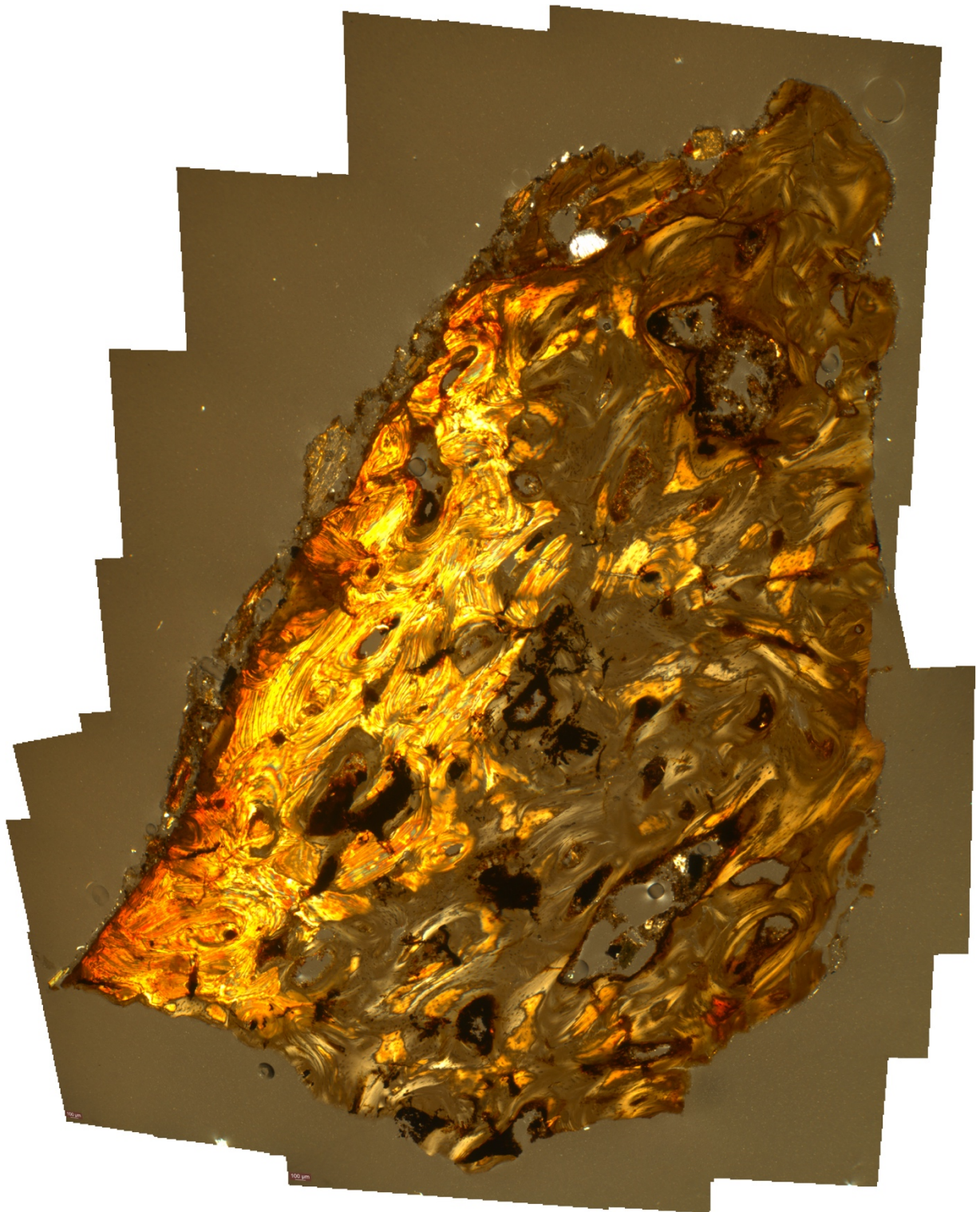


Figura A.II.7- Muestra 70-2099

Muestra de México:



Figura A.II.8- Muestra MPG-PD-001





10.3- Anexo III

Tabla A.III.1- Todas las medias del área de las osteonas. Medidas en μ^2 .

(Chile)MUSA1637	(Chile)SGO-11	(Chile) s/n	(Chile)GEOUACH126	(Chile)SGO-244C	(El Salvador) 70-1169
36142,04	57336,7	448771,21	28943,76	102390,62	98957,93
	37294,81	119028,14	233093,07	60988,66	190373,32
	59288,63	269472,91	30584,83	28027,05	
	39802,41	157132,27	33595,22	103366,09	
	33599,02	50876,18	121522,79	78123,39	
	41721,24	144565,03	43814,94	127151,05	
	18402,08	88898,84	46659,92	86302,35	
	61477,02	56021,11	131578,31	67112,89	
	38351,76	388011,26	12502,35	145969,29	
	57691,45	500142,67	31312,59	86651,12	
	108675,61	247058,89	75257,8	74758,74	
	209578,81	819927,55	63619,47	92561,42	
	90115,14	311707,09	200395,83	83351,51	
	37451,78	255087,31	58384,35	31452,04	
	18558,09	368268,76	141719,46	38490,12	
	67577,43	156972,15	42561,95	128136,05	
	38637,1	112156,74	42144,34	185923,09	
	84594,36		226893,93	48761,67	
	69513,04		154291,99	89929,61	
	120106,13		199686,3		
	71858,67		30819,26		
	56836,69		132357,17		
	82098,36		92557,15		
	27907,6		61647,98		
	55815,18		86169,69		
	28112,12		162174,35		
	100509,89		70007,02		
	66991,22		70079,14		
			99953,96		
			122114,45		
			178304,27		
			77933,37		
			72561,1		
			125561,42		
			39488,07		
			81548,77		
			125183,09		
			75087,63		
			121617,34		
			34360,53		
			82728,69		
			120519,01		
			58139,6		
			53578,38		
			91645,31		
			82721,49		
			24763,95		
			36619,82		
			112089,22		
			58165,61		
			40474,04		

(El Salvador) 70-1164	(El Salvador) 70-2099	(Costa Rica) G-24NC	(México) MPG-PD-001
115314,41	73121,42	50306,84	237602,78
88550,06	108730,4	42394,42	84935,92
27803,57	80072,03	34198,05	131913,08
114697,32	52217,6	32823,32	67260,74
57375,87	178392,49	53727,12	116216,84
202966,98	110795,75	31725,42	122897,62
83405,44	100279,41	45014,93	50532,25
241116,12	61637,92	229624,2	107741,29
219106,13	47203,53	122500,45	68959,73
93662,12	116040,42	114174,85	101506,43
143263,25	123741,77	103208,05	51573,74
207011,68	141625,02	68131,07	37348,1
100983,53	317596,39	60221,58	82464,37
204274,38	155094,71	57188,48	90085,45
126872,46	85205,56	90880,5	23311,1
100145,47		61174,6	130984,11
77054,09		87865,16	38529,43
135364,3		228832,04	99999,52
84680,28		59615,36	46587,67
175988,54		33201,93	20683,39
63332,45		23601,25	81004
202639,7		43090,11	47802,65
100011,37		84418,62	90343,93
		17708,33	28509,35
		44286,2	51011,65
		30425,25	136773,75
		120099,1	77854,02
		67060,48	89550,3
		167172,64	56849,19
		16520,52	78933,84
		33941,36	17441,07
		75912,54	95230,94
		86632,21	52152,14
		78462,7	31792,35
		44194,53	140718,84
		50744,32	160110,55
		155403,82	93057,11
		44370,69	34389,69
		62565,87	96923,93
		67441,56	141610,49
		31978,11	85943,77
		46555,53	115028,63
		74697,39	59777,3
		47381,23	60682,5
		61539,16	127607,51
		50024,23	117499,5
		37797,08	86589,84
		27942,02	114014,15
		22037,26	30997,57
		121223,25	34390,27
		82613,39	47269,7
		15028,68	59717,91
		206088,04	22971,99
		202154,3	71820,43
		50147,27	40245,53
		45850,32	37939,78
		160550,06	61827,65
		43078,36	46819,48
		64020,21	66073,68
		64277,95	59546,04
		58351,2	41847,82
		50208,87	48742,85
		194640,35	37966,41
		41578,26	34049,53
		90608,4	51586,22
		58193,96	99494,38
		51476,27	56698,38



	40916,18	25000,39
	65550,07	89990,07
	51242,18	35111,28
	180234,33	17198,59
	44397,99	23279,04
	73419,3	38234,86
	34420,76	88750,03
	85600,28	71945,13
	30479,06	41147,99
	30914,02	41516,86
	77315,78	52486,03
	145455,96	19950,93
	116329,54	29964,82
	75147,5	64273,34
	28952,63	13448,41
	79752,44	63320,42
	44102,25	9034,96
	144395,47	39648,86
	53527,31	57128,03
	42609,2	33403,6
	87582,62	23043,45
	51321,41	79393,56
	46459,19	38648,11
	60202,91	24823,93
	67879,22	41043,37
	62491,36	65509,08
	36752,52	28172,1
	35419,47	90990,86
	100670,46	54201,12
	135268,31	27049,2
	127756,56	23119,92
	77821,83	25088,1
	84893,1	47673,18
	48131,25	39378,96
	111000,13	87599,97
	37017,39	44840,75
	49541,48	36071,89
	24928,68	33815,63
	55418,05	35128,54
	127658,72	68757,62
	101166,26	83495,9
	50610,91	50301,13
	64870,36	59895,3
	67956,1	66425,01
	60266,57	30339,57
	47320,64	31493,48
	50710,22	42923,72
	30879,6	68601,58
	28334,8	71374,02
	8188,11	52366,22
	56224,75	23501,77
	48065,04	23753,42
	36947,63	52838,81
	7106,77	26950,48
	54335,05	25635,5
	72562,21	41739,06
	73084,77	17897,29
	104202,29	24299,31
	95834,13	14800,91
	104256,67	31485,18
	158796,66	62788,3
	176049,53	46360,58
	56176,23	34873,59
	54422,9	32551,6
	53573,45	37575,09
	60941,68	36819,61
	42721,05	105983,92
	73398,33	83474,69

		43331,52	87525,18
		75695,88	31161,29
		42924,54	108288,33
		19283,03	61755,08
		32017,72	52423,36
		68616,32	48384,7
		21323,85	21359,84
		124754,69	100694,52
		37830,19	16778,09
		187365,62	26583,13
		145490,65	46288,9
		62518,65	88385,94
		81293,17	45427,61
		87267,2	40804,51
		50556,41	101870,09
			58541,95
			26729,63
			35285,85



Tabla A.III.2- Todas las medidas del perímetro de las osteonas, medidas en μ .

(Chile)MUSA1637	(Chile)SGO-11	(Chile) s/n	(Chile)GEOUACH126	(Chile)SGO-244C	(El Salvador) 70-1169
716,22	875,86	2526,24	631,21	1176,42	1254,5
	705	1266,65	1808,25	939,76	1606,16
	900,88	1916,13	670,44	607,05	
	731,1	1517,92	672,72	1186,35	
	698,69	828,99	1322,25	1016,6	
	753,98	1454,23	759,99	1358,62	
	508,02	1097,39	801,43	1063,72	
	906,84	858,82	1345	977,89	
	738,66	2331,46	418,93	1397,1	
	890,38	2742,82	647,33	1100,39	
	1246,68	1850,68	1039,22	1031,45	
	1722,75	4344,83	929,08	1147,23	
	1082,2	2061,76	1645,91	1098,43	
	701,38	1876,08	912,4	654,17	
	493,46	2324,62	1375,93	746,8	
	955,06	1433,04	761,44	1330,07	
	726,76	1253,51	750,67	1571,01	
	1110,02		1875,47	808,46	
	977,57		1456,27	1108,08	
	1299,07		1700,62		
	981,79		645,96		
	873,13		1497,84		
	1047,67		1131,4		
	636,13		927,63		
	870,32		1083,15		
	623,87		1543,83		
	1151,05		977,54		
	969,5		964,02		
			1169,58		
			1281,2		
			1606,93		
			1033,5		
			975,35		
			1315,93		
			738,7		
			1068,67		
			1304,2		
			994,92		
			1312,75		
			690,33		
			1047,85		
			1289,87		
			888,88		
			859,74		
			1116,93		
			1067,34		
			573,09		
			707,88		
			1219,11		
			878,91		
			725,94		

(El Salvador) 70-1164	(El Salvador) 70-2099	(Costa Rica) G-24NC	(México) MPG-PD-001
1251,16	1001,16	831,55	1815,23
1105,2	1197,03	763,5	1072,52
596,88	1059,88	682,04	1334,58
1237,27	836,82	653,51	959,29
861,05	1577,95	843,68	1262,43
1706,97	1265,57	651,03	1300,34
1057,23	1190,69	778,53	836,74
1800,88	901,68	1771,75	1234,65
1683,69	785,11	1285,01	1006,45
1135,31	1244,58	1290,12	1198,25
1398,02	1302,63	1172,35	852,72
1672,9	1362	955,91	726,62
1174,85	2046,16	904,3	1041,79
1679,44	1492,8	874,75	1099,18
1307,86	1092,15	1094,39	589,8
1150,75		898,75	1337,16
1007,34		1123,59	719,28
1341,26		1796,02	1150,33
1056,85		889,93	798,86
1604,61		663,65	531,37
942,89		571,54	1065,07
1645,66		757,15	818,41
1151,87		1073,74	1103,57
		509,26	623,93
		782,65	851,6
		637,78	1350,94
		1282,24	1043,97
		934,19	1108,56
		1609,29	928,76
		486,94	1048,22
		689,99	490,26
		1052,24	1133,25
		1132,58	835,67
		1047,53	655,43
		773,14	1391,91
		836,05	1506,03
		1484,94	1152,6
		762,29	684,66
		915,44	1146,47
		950,99	1413,21
		657,91	1074,87
		810,7	1312,85
		1005,17	909,23
		796,23	921,33
		922,55	1348,56
		842,39	1282,97
		702,38	1108,27
		621,76	1250,04
		536,78	665,13
		1315,19	688,28
		1056,25	814,83
		443,28	923,98
		1670,6	551,45
		1714,73	980,92
		825,34	731,27
		786,12	722,52
		1577,54	929,65
		826,94	783,17
		923,08	929,92
		923,75	897,02
		890,76	793,31
		813,45	810,56
		1660,37	714,58
		761,77	677,17
		1153,23	854,27
		925,86	1171,12
		839,16	869,49



	754,12	586,33
	929,5	1089,66
	821,98	695,97
	1635,86	478,67
	775,12	576,17
	1107,13	723,44
	712,51	1128,56
	1067,38	1032,26
	645,88	738,36
	672,05	750,71
	1006,92	853,06
	1447,79	521,67
	1263,06	639,83
	1038,31	973,55
	643,86	422,24
	1040,3	932,4
	768,51	347,85
	1427,22	745,42
	847,26	880,67
	758,53	663,28
	1088,08	577,69
	827,28	1045
	809,08	731,07
	908,14	571,4
	962,13	743,02
	915,69	936,13
	709,26	614,95
	682,79	1112,17
	1175,96	856,85
	1384,95	596,41
	1313,5	558,32
	1034,6	583,8
	1123,05	784,27
	835,06	726,69
	1254,88	1078,32
	721,28	762,56
	813,68	700,99
	572,87	665,46
	860,29	679,86
	1362,64	1004,65
	1167,28	1038,61
	836,85	834,81
	945,31	888,46
	963,92	951,8
	911,76	651,84
	809,98	657,36
	854,31	797,33
	642,51	973,55
	630,9	985,34
	330,2	837,66
	889,8	575,16
	800,34	570,89
	703,69	843,23
	304,92	631,05
	845,79	609,9
	1023,32	742,32
	999,37	491,03
	1219,41	566,42
	1184,57	449,1
	1215,73	659,23
	1474,43	940,83
	1569,74	787,15
	886,96	686,38
	850,81	672,59
	853,9	714,85
	897,83	735,46
	743,34	1260,32
	1011,22	1058,34

		784,24	1109,18
		995,45	672,27
		767,67	1242,4
		512,37	937,04
		668,64	843,79
		956,4	812,14
		527,72	576,35
		1287,89	1247,19
		743,58	476,66
		1618,22	589,15
		1408,24	781,68
		903,35	1093,04
		1038,35	786,56
		1086,97	732,45
		822,38	1172,13
			879,56
			595,72
			679,88



Tabla A.III.3- Todas las medidas de el diámetro de las osteonas, medido en μ .

(Chile)MUSA1637	(Chile)SGO-11	(Chile) s/n	(Chile)GEOUACH126
169,62	253,96	631,88	170,84
	202,17	349,03	483,54
	261,58	531,73	191,3
	204,92	396,27	196,26
	172,32	226,24	334,81
	205,35	355,46	217,42
	127,37	277,88	210,07
	255,75	236,25	359,3
	202,89	617,94	111,45
	255,58	622,39	191,23
	315,03	459,16	255,69
	439,06	923,15	235,24
	320,31	560,87	474,85
	209,45	491,95	234,67
	144	523,62	404,15
	249,68	399,04	206,68
	197,75	307,91	210,75
	267,88		405,28
	255,75		419,17
	329,84		454,81
	266,58		194,59
	231,6		303,79
	303,31		299,08
	174,33		254,52
	229,88		305,99
	177,19		390,55
	325,7		291,35
	244,34		283,32
			315,32
			371,51
			391,44
			273,91
			287,24
			349,53
			189,9
			286,42
			369,56
			289,75
			310,98
			191,99
			317,36
			379,82
			253,78
			230,19
			302,47
			273,57
			165,27
			184,99
			350,27
			266,79
			213,12



(El Salvador) 70-1169	(El Salvador) 70-1164	(El Salvador) 70-2099	(Costa Rica) G-24NC	(México) MPG-PD-001
258,91	330,54	286,1	215,76	517,34
447,11	312,5	345,07	218,1	305,92
	182,67	284,88	179,16	400,03
	324,13	220,6	194,44	273
	252,21	423,5	256,7	368,98
	454,15	323,58	171,01	387
	304,58	318,78	227,96	229,4
	520,77	270,55	495,27	361,6
	521,92	221,25	360,5	290,16
	304,47	339,38	303,65	336,94
	367,37	378,39	324,02	220,97
	458,53	396,4	274,19	192,74
	334,37	552,13	252,92	317,19
	436,69	372,76	248,29	328,46
	367,2	273,84	303,08	142,32
	334,22		272,99	390,79
	277,89		271,85	209,55
	373,21		499,79	350,27
	316,41		258,23	232,47
	353,24		197,2	156,11
	223,28		145,75	295,4
	458,02		219,45	225,7
	331,79		278,29	327,38
			120,65	176,06
			192,85	213,23
			178,38	374,79
			339,21	276,66
			277,42	311,3
			360,21	235,42
			120,73	307,71
			177,29	140,6
			309,89	323,59
			276,17	237,08
			268	192,92
			223,9	393,75
			227,91	419,33
			364,61	305,4
			212,14	197,77
			246,99	335,2
			249,98	364,66
			193,66	311,05
			208,54	296,14
			291,41	253,69
			234,01	257,3
			238,51	352,42
			227,17	381,06
			194,68	308,28
			182,73	336,11
			159,91	182,93
			325,07	197,75
			285,44	239,78
			132,02	233,37
			472,07	153,68
			403,59	291,01
			233,09	222,35
			212,07	206,58
			348,37	274,66
			203,58	232,15
			277,27	267,75
			259,25	259,96
			241,32	176,52
			233,88	228,35
			408,21	214,41
			224,05	190,64
			282,09	208,05
			217,29	330,35
			234,3	233,03



		196,11	159,84
		268,91	326,77
		232,84	195,72
		402,87	133,32
		226,74	157,52
		296,59	213,67
		181,66	262,41
		322,27	291,77
		185,77	212
		174,41	194,92
		304,48	224,89
		404,17	145,83
		366,74	166,98
		282,79	232,8
		159,89	124,55
		280,03	265,63
		229,7	107,96
		411,01	212,61
		242,71	263,97
		213,3	194,14
		312,52	152,05
		231,12	315,12
		207,87	194,84
		257	162,68
		244,12	212,24
		252,28	271,55
		197,43	180,9
		196,33	299,9
		346,22	239,5
		364,87	179,63
		331,91	147,86
		262,12	162,99
		283,97	234,07
		219,39	191,97
		309,01	316,78
		205,35	230,53
		242,96	199,15
		170,72	186,62
		248,34	207,72
		315,68	228,18
		329,26	319,67
		228,13	217,32
		268,07	270,74
		274,76	283,71
		260,72	165,68
		222,84	176,15
		211,24	192,28
		191,28	264,42
		171,77	246,46
		98,29	235,48
		233,01	148,69
		241,47	158,7
		196,57	247,09
		94,52	143,68
		256,37	174,24
		250,46	215,29
		281,06	140,26
		324,91	166,07
		326,54	130,66
		303,05	174,04
		404,62	240,8
		405,28	234,52
		245,43	203,93
		233,62	177,48
		239,77	212,97
		275,12	209,67
		220,16	272,77
		280,41	283,3

			201,22	311,57
			289,24	169,3
			187,07	325
			131,03	226,26
			170,17	244,09
			267,63	230,8
			145,16	129,14
			365,26	268,01
			174,39	140,19
			446,12	180,95
			393	231,33
			267,48	321,93
			288,53	228,12
			313,65	214,88
			226,16	320,39
				243,48
				167,28
				201,43



Tabla A.III.4- Todas las mediciones para el área de los canales de Havers.

Medidas en μ^2 .

(Chile)MUSA1637	(Chile)SGO-11	(Chile) s/n	(Chile)GEOUACH126	(Chile)SGO-244C
47278,32	8129,31	7561,83	6229,91	3209,87
29324,62	6072,15	7260,35	7121,93	16322,44
101420,07	8217,98	23326,27	2078,21	5892,44
32725,86	4286,92	3838,84	1493,38	1210,65
10018,92	4340,12	7756,9	13766,54	903,26
27969,62	6154,91	20149,5	43739,36	900,89
12055,03	3125,93	3780,91	7413,75	6796,91
3875	4817,76	4989,36	16892,7	4495,02
10770,89	5288,31	20604,88	2471,64	1456,56
46485,73	2752,33	4412,8	2729,2	4445,36
3154,3	7383,3	175575,29	1794,66	1527,5
5030,57	5977,57	25038,27	2586,24	2136,37
	6897,38	252729,53	3446,36	4316,48
	1688,29	17615,93	1146,03	4761,01
	8439,07	6383,12	4398,62	1415,18
	4674,71	65787,43	43892,91	3315,09
	6008,31	5532,79	2023,86	5536,58
	20543,18	8332,86	2280,61	10415,82
	5648,9	10515,2	5320,24	2647,11
	5080,23	20511,02	6156,11	1587,79
	1710,75	14493,89	4437,08	7499,16
	10219,57	22750,59	1820,71	8635,32
	3759,63	6995,54	984,84	1170,45
	5269,4	11416,7	1488,49	1263,85
	6668,03	8940,52	10414,67	760,2
	5712,75	10241,91	13285,24	5090,87
	3585,84	10020,67	5722,22	2629,38
	4790,58	9811,27	3720,62	2992,34
	1454,2	14647,69	3040,81	2675,49
	23999	15239,23	4731,44	3417,95
	10510,42	17666,9	4474,89	5303,68
	4147,42	21492,98	2846,9	3216,97
	6268,42	16817,45	3759,61	913,9
	2932,04	3974,81	5148,78	3559,83
		4478,46	3750,16	2221,49
		6799,27	9998,45	2271,15
		3456,98	30749,45	9987,84
		206553,13	2903,28	10159,27
		25012,24	1821,94	21157,96
		3644,96	5339,24	
		102600,3	15910,07	
		175014,72	2916,29	
		122839,59	9468,2	
		125069,36	4125,4	
		91989,3	2329,49	
		19999,37	2293,61	
		3538,55	1996,86	
		8462,73	4396,87	
		20988,93	3410,85	
		363881,05	10292,86	
		19568,91	17522,45	
		302406,62	1767,5	
		21670,99	2896,57	
		19120,83	3609,49	
		27884,99	4558,86	
		1639,81	575,77	
		89976,33	3843,58	
		111885,58	9673,39	
		92097,07	3376,58	
		6971,88	4537,58	
		3653,12	2385,84	

		39907,77	41416,36	
		14137,67	1876,27	
		34430,28	2791,36	
		19556,05	742,47	
		89234,1	1864,45	
		2485,13	3421,51	
		64000,94	4518,66	
		279225,88	6776,81	
		6108,78	3501,91	
		18703,49	4219,55	
		6393,71	3499,54	
		20514,88	1955,49	
		268371,05	7222,52	
		21710,16	3469,98	
		21576,56	1441,19	
		22392,33	2203,76	
		29493,09	3317,47	
		22982,29	3600,03	
		27208,93	1752,13	
			4121,41	
			5239,85	
			3363,58	
			3084,56	
			3984,27	
			4071,76	



(Chile)UACH.PV.TR.19	(El Salvador) 70-1169	(El Salvador) 70-1164	(El Salvador) 70-2099	(Costa Rica) G-24NC	(México) MPG-PD-001
12786,32	8645,94	2455,59	35088,78	1610,17	51693,45
16430,09	23815,91	1847,9	3981,91	11010,91	40243,7
7017,99	9762,42	32273,75	2991,16	9107,33	28304,83
4625,06	38963,77	21186,37	3552,74	22350,71	36540,18
17459,76	39356,84	6767,34	17659,66	6660,73	30982,51
40817,41	6080,45	2888,3	1937,74	3960,95	15651,92
7883,95	735,38	7048,73	13079,52	265,01	6790,59
15739,54	8618,79	12883,25	1980,31	1141,67	16017,27
223897,6	8506,55	35251,9	2178,94	4005,9	7609,36
25889,41	9387,21	23987,18	4600,24	946,46	11195,07
21750,27	65092,29	46968,31	1371,44	1256,43	4140,28
16346,1	10268,19	7391,89	36994,61	5436,24	15090,2
8707,44	8596,41	15397,8	14784,37	8533,54	20941,82
10472,63	7827,85	3955,04	2300,71	1268,26	9055,77
5546,28	77132,89	16042,58	3078,65	1269,44	14213,9
6748,29	5154,77	1219,76	2091,45	3277,13	4328,85
37558,08	2374,76	5114,42	1635,09	789,11	16551,3
32915,67	72054,58	5863,31	1740,31	3833,17	21699,96
33934,32		3058,24	12381,97	4796,2	2461,78
10948,23		4476,75	1845,53	2223	3092,04
59009,73		6794,39	7424,69	1411,41	4561,05
26780,23		18672,44	2527,7	4922,79	2881,16
59278,21		33730,58	26270,16	10155,76	6516,97
15311,67		2451,33	11082,65	5293,05	4933,98
20291,43		19127,92	2300,71	13052,34	3387,74
23598,26		8984,25	5765,96	6978,98	4279,43
8864,72		5264,67	5885,37	1025,03	4588,92
3844,77		33533,01	3162,59	3591,76	1100,39
11919,72		15932,44	3570,47	2554,9	2258,89
3819,94		5734,35	3574,02	1330,06	1419,36
3821,12		4429,42	1360,8	1338,34	7900,76
10136,85		16176,27	9085,8	2773,62	9886,2
14176,69		10805,08	2350,37	1953,4	3497,26
52895,09		6042	1059,32	4364,96	25806,6
27473,76		8389,23	2174,21	1019,32	6593,19
		3394,26	1734,4	1792,39	10710,35
		5180,71	3199,24	1387,51	1889,57
		2307,01	6722,43	831,08	5700,96
		4686,19	1579,52	72049,71	11942,99
		15882,65	671,53	3170,43	3339,59
		3674,5	1140,12	419,09	2382,86
		2624,65	2249,53	2943,12	2096,2
		6626,65	6567,82	1458,54	11473,58
		6613,65	1475,66	1817,25	4901,89
		4894,62	4595,94	2462,47	5589,88
		20170,8		6980,15	7739,83
		6192,22		49547,72	7013,81
		1663,41		3462,85	3091,29
		4545,38		36176,2	3208,69
				2026,61	3984,18
				2603,96	3920,15
				12837,59	4186,94
				2194,61	33524
				2441,88	1232,86
				27802,36	8850,36
				5136,93	4130,96
				5998,21	1113,74
				1856,25	15962,81
				1498,96	7417,39
				651,88	8901,58
				12149,04	1170,92
				4393,96	2446,65
				2107,06	1033,93
				1021	2126,23
				35460,43	4192,9
				21765,11	5827,18
				16277,99	4549,06



			17392,45	5280,44
			877,84	4042,81
			1086,07	1509,21
			12545,37	863,59
			1378,29	1092,3
			1597,16	2082,16
			1251,7	3194,71
			1090,8	1918,97
			21577	16756,82
			1761,6	3680,18
			556,05	8652,82
			571,43	1742,68
			2791,35	27704,71
			1353,7	2625,31
			1328,87	3071,97
			3005,34	15711,45
			1961,39	4577,06
			3782,09	2733,41
			4174,6	8292,88
			2965,14	5207,85
			5540,13	1062
			929,27	3911,83
			935,18	31059,65
			49336,24	6887,01
			2810,26	2077,09
			2008,68	1810,74
			6935,21	2657,58
			3934,6	8599,81
			2061,88	5284,11
			1195,28	4182,85
			3799,82	4569,84
			6345,26	5606,81
			45868,07	5085,08
			15361,13	2366,85
			3920,73	2859,99
			1015,08	2537,18
			2670,21	1533,03
			4444,84	1369,84
			2575,57	2026,17
			4526,47	2888,58
			1110,91	1212,61
			1614,91	2609,84
			760,72	2091,69
			2553,09	16323,73
			1381,84	2001,16
			1146,41	1156,62
			4882,58	8781,1
			11764,56	4849,09
			650,69	510,81
			1701,27	16175,9
			792,66	5698,45
			2535,34	1631,01
			1476,49	2842,69
			17998,22	5443,05
			30820,45	2912,78
			2277,43	4358,48
			2725,82	1808,01
			2312,92	4958,38
			1006,8	9308,54
			15913,63	6499,11
			1178,35	1010,92
			4028,39	1506,28
			5206,74	1115,46
			36700,19	1676,15
			10281,07	2156,07
			2394,11	4841,96
			1133,8	3601,77
			5632,36	4345,41



			1100,7	1325,72
			1153,9	5193,58
			3973,63	3848,86
			1299,32	3708,68
			2362,19	1473,02
			3466,43	1816,33
			1643,36	1261,57
			1309,96	1094,07
			83385,88	3379,63
			3095,2	1941,06
			1053,41	3642,16
			2534,8	4233,75
			4043,38	3452,09
			6111,18	798,28
			1278,04	1275,83
			2917,84	5692,51
			2772,43	2387,72
			4769,28	3201,44
			2081,98	2350,89
			2527,7	7456,43
			1137,34	1338,7
			1941,29	1999,76
			1501,48	1919,2
			1849,07	1665,67
			2286,51	1574,45
			1056,95	6607,74
			2694,4	2962,78
			2081,98	1396,27
			2136,36	2171,84
			5262,29	3092,83
			1073,5	7818,39
			1142,07	1860,9
			2369,27	2570,27
			1908,19	2817,36
			955,27	1423,46
			1963,75	4802,4
			24150,25	2216,77
			73372,91	1592,53
			55405,94	951,73
			11162,85	876,07
			3603,75	995,48
			1527,21	1214,2
			1337,79	2916,68
			4734,36	3749
			17583,06	1599,62
			1204,01	1253,21
			2805,81	562,76
			23450,39	1156,27
			15283,95	679,81
			3008,25	1412,82
			11065,77	1813,61
			4092,69	1086,51
			5724,08	1742,68
			3319,61	2447,31
			1386,33	1325,33
			2200,84	3148,41
			2598,63	2557,27
			2902,89	1957,85
			4392,21	1077,05
			2328,7	1013,21
			7174,34	3311,56
				1924,75
				2768,89
				13054,71
				1805,34
				1972,04
				3058,55
				2415,39

				1778,15
				3908,61
				2833,92
				1490,85
				1489,67
				5874,74
				7829,04
				5426,65
				1346,61
				2857,56
				1753,32

Tabla A.III.5- Perímetros de los canales de Havers. Medidas en μ .

(Chile)MUSA1637	(Chile)SGO-11	(Chile) s/n	(Chile)GEOUACH126	(Chile)SGO-244C
895,01	331,19	323,95	359,86	216,27
709,85	285,76	319,65	322,19	485,15
1260,96	332,51	622,93	172,56	288,55
717,58	243,28	230,99	140,9	129,73
504,14	245,04	333,45	425,97	112,44
651,52	296,04	529,37	774,44	115,96
423,6	204,19	226	327,39	300,82
245,79	257,88	257,32	489,35	252,3
384,96	274,05	602,3	187,54	152,48
961,94	195,32	249,12	192,06	244,74
212,32	324,89	1540,05	159,61	145,33
292,77	287,15	601,69	187,66	172,53
	304,23	2030,34	222,07	242,12
	163,06	493,44	125,43	262,96
	357,46	299,25	249,12	142,28
	250,18	946,05	784,82	216,24
	339,71	336,28	166,29	280,98
	540,52	331,19	175,89	377,7
	276,59	375,61	305,16	190,67
	262,53	526,87	291,29	144,94
	153,09	437,11	252,45	319,27
	376,4	600,66	158,49	340,2
	231,06	308,85	116,92	124,71
	289,54	396,34	152,8	130,38
	325,5	357,52	378,37	100,15
	285,72	378,99	420,74	257,09
	223,51	366,55	289,39	201,11
	259,6	356,74	228,23	203,33
	148,58	444,29	211,68	203,16
	557,5	455,37	252,78	217,27
	397,94	482,48	249,55	263,51
	249,78	594,98	197,73	208,81
	291,97	486,64	225,47	118,66
	204,81	242,34	263,61	221,9
		248,59	224,07	180,25
		300,83	389,46	195,29
		214,74	643,12	364,35
		1686,59	200,46	379,71
		676,83	156,25	567,72
		228,79	270,08	
		1255,24	477,22	
		1612,85	199,51	
		1293,43	388,61	
		1643,78	238,66	
		1161,44	176,15	
		569,36	179,26	
		217,58	166	
		339,74	242,15	
		621,83	223,06	
		2235,28	381,38	
		505,16	513,88	
		2026,24	155,01	
		589,5	199,5	
		511,05	220,69	
		607,36	251,85	
		155,3	89,23	
		1158,08	232	
		1224,26	364,69	
		1152,79	215,13	
		314,43	249,05	
		230,23	180,94	
		883,53	739,15	
		543,19	158,72	
		692,74	195,07	

		581,47	100,38	
		1139,33	162,43	
		183,69	213,47	
		978,93	249,09	
		1984,37	300,12	
		286,28	215,86	
		498,12	240,17	
		291,88	215,89	
		518,06	162,73	
		1937,67	311,85	
		663,54	216,05	
		574,72	144,36	
		557,05	176,26	
		623,11	210,34	
		629,85	220,77	
		647,79	153,56	
			235,94	
			268,15	
			217,85	
			204,43	
			233,78	
			232,85	



(Chile)UACH.PV.TR.19	(El Salvador) 70-1169	(El Salvador) 70-1164	(El Salvador) 70-2099	(Costa Rica) G-24NC	(México) MPG-PD-001
410,33	363,51	182,03	689,63	146,78	856,88
465,04	771,62	157,76	236,24	387,43	752,94
309,17	370,4	693,07	202,96	344,82	653,78
254,16	736,88	571,48	224,38	564,76	741,31
476,12	795,41	299,92	515,57	302,03	647,44
799,76	287,59	200,42	161,82	235,55	466,66
331,52	101,12	307,92	430,7	65,28	301,35
473,98	354,77	439,54	170,86	127,49	476,53
1744,07	355,54	681,72	172,79	233,94	316,95
607,58	361,5	571,06	249,15	111,8	398,36
599,63	1196,51	839,61	136,89	129,11	238,2
491,17	408,43	320,33	707,62	270,42	468,39
350,66	345,39	482,76	467,38	334,74	551,61
377,16	343	232,74	177,96	128,81	355,03
272,16	1150,61	474,81	209,41	129,72	454,87
296,13	294,75	130,67	170,57	206,47	245,53
738,34	196,22	263,71	146,86	104,87	484,13
723,74	1133,78	285,19	157,05	226,45	553,13
691,04		204,08	417,44	259,95	181,52
385,37		256,55	157,13	182,59	221,4
921,48		307,06	330,84	139,06	250,84
586,68		500,32	191,57	258,83	207,84
1102,63		763,65	587,79	377,73	311,99
457,16		181,46	386,96	266,22	303,73
553,16		504,05	178,42	454,84	222,54
583,59		352,6	279,05	326,92	237,27
367,67		293,92	284,6	127,86	273,77
233,78		693,53	207,28	219,98	122,67
401,5		466,48	218,55	199,87	174,85
222,91		279,15	233,21	135,1	137,48
231,19		241,19	137,47	135,45	336,27
371,47		474,82	371,19	198,42	380,71
441,88		389,22	179,54	161,4	224,34
1002,29		282,97	120,82	247,51	624,33
621,3		412,35	171,74	118,27	306,11
		214,68	153,65	155,82	384,24
		282	219,66	139,27	158,73
		191,89	327,44	106,75	281,92
		248,33	144,71	999,24	415,74
		458,87	102,54	206,35	219,79
		229,22	123,99	83,24	184,3
		190,3	182,71	199,17	181,42
		332,25	319,98	139,65	445,82
		299,35	142,69	160,35	258,48
		255,67	260,99	183,44	286,87
		530,74		306,89	326,61
		328,14		825,34	304,63
		159,19		219,64	203,66
		268,6		701,3	209,83
				168,7	233,78
				190,57	237,2
				423,22	241,44
				172,44	702,19
				182,71	136,33
				605,88	345,82
				264,53	235,7
				288,9	122,79
				161,41	495,18
				147,67	314,39
				95,98	351,47
				438,12	125,35
				241,9	187,47
				172,02	117,02
				118,37	175,35
				707,97	238,89
				549,93	288,24
				508,58	247,26

			482,11	272,76
			109,61	231,34
			125,87	143,09
			408,36	109,89
			135,36	126,07
			143,55	167,92
			130,06	209,29
			118,47	161,54
			525,04	474,26
			151,19	224,76
			92,74	354,61
			90,03	155,6
			193,47	602,32
			136,61	193,7
			133,27	204,41
			201,14	459,23
			161,5	246,95
			224,06	192,25
			236,91	342,1
			198,75	277,77
			271,72	130,55
			110,6	229,46
			114,12	639,53
			827,04	303,18
			192,79	174,95
			164,12	169,92
			300,05	191,3
			229,23	339,79
			165,92	268,02
			129,34	251,07
			233,02	245,52
			298,86	285,95
			783,98	268,13
			494,05	183,64
			229,97	203,14
			116,21	199,73
			190	147,09
			245,11	136,34
			190,35	164,67
			251,72	200,2
			125,59	128,55
			150,3	192,34
			101,04	166,37
			184,77	467,5
			137,39	170,07
			126,5	127,08
			255,82	398,96
			402,74	252,46
			94,78	85,77
			151,19	473,7
			107,8	277,73
			189,57	150,69
			142,79	197,14
			495,36	276,04
			657,43	197,03
			191,19	243,05
			193,99	158,7
			175,82	261,41
			119,17	364,12
			485,56	303,03
			131,63	119,41
			232,41	144,93
			264,29	129,24
			698,97	163,09
			364,6	199,41
			180,41	258,14
			124,66	223,29
			282,46	251,58



				123,82	135,81
				123,89	264,44
				227,8	233,13
				131,26	226,71
				177,21	143,49
				214,22	163,26
				148,96	130,79
				130,78	126,98
				1088,87	212,55
				203,66	163,75
				121,11	222,72
				185,11	237,69
				235,36	218,76
				290,9	103,19
				130,21	131,92
				209,08	282,09
				195,04	180,34
				258,62	208,29
				170,18	192,34
				197,81	323,09
				128,41	133,75
				162,1	165,74
				143,42	162,7
				158,11	151,49
				174,99	147,35
				118,47	406,24
				194,22	216,42
				166,98	138,26
				170,49	171,34
				266,1	205,21
				119,12	326,49
				123,42	163,22
				176,17	189,15
				164,17	198,2
				115,24	142,26
				161,26	252,63
				566,49	176,82
				974,27	145,22
				875,91	122,21
				389,49	110,39
				219,43	116,56
				142,05	129,13
				133,03	200,95
				253,76	225,32
				486,52	148,77
				127,78	129,57
				194,61	88,26
				557,32	126,42
				462,5	97,65
				202,29	136,72
				391,84	161,72
				234,38	123,86
				296,78	152,64
				214,9	182,28
				135,6	144,22
				169,92	225,67
				186,45	188,14
				197,72	166,39
				241,66	123,88
				176	118,7
				308,42	209,89
					163
					198,63
					419,3
					156,79
					165,53
					207,82
					182,3

				168,64
				234,11
				201,18
				143,13
				141,33
				303,89
				325,96
				315,5
				142,7
				196,72
				157,89



Tabla A.III.6- Todas las medidas del diámetro de los canales de Havers.

Medidas en μ .

(Chile)MUSA1637	(Chile)SGO-11	(Chile) s/n	(Chile)GEOUACH126	(Chile)SGO-244C
173,93	94,6	84,76	61,16	52,79
127,35	77,53	76,11	80,81	135,47
297,45	95,34	120,8	47,83	71,78
166,61	67,41	65,24	42,39	35,88
64,93	63,73	89	129,71	29,99
139,41	76,35	144,5	203,91	29,54
95,71	56,54	67,32	78,89	84,81
56,25	67,89	78,77	130,59	65,81
103,34	65,54	103,05	45,65	31,58
167,24	55,69	61,96	55,42	70,71
60,38	78,52	455,16	44,14	41,32
51,1	76,66	155,77	51,09	48,31
	85,6	429,66	56,11	66,14
	40,75	127,87	31,52	64,79
	90,09	74,6	62,68	35,6
	70,84	263,15	196,57	55,4
	68,33	78,26	46,74	78,29
	127,18	99,55	47,84	105,47
	76,11	106,85	59,84	52,19
	76,11	135,96	82,29	43,49
	44,58	125,84	63,14	94,6
	97,58	115,56	44,59	98,23
	62,27	85,82	31,53	35,88
	60,51	109,51	32,62	36,97
	70,24	89,05	100,06	30,45
	78,02	97,64	125,36	78,29
	56,9	100,07	65,1	44,6
	63,93	106,59	57,63	58,29
	39,14	131,44	45,67	46,65
	159,39	137,67	67,41	63,06
	96,1	138,14	63,82	78,29
	68,43	132,91	57,63	58,72
	78,42	120,92	65,24	32,26
	51,98	57,12	76,46	62,6
		67,66	59,8	44,25
		84,68	84,97	39,67
		62,94	183,05	109,82
		435,73	51,12	109,89
		122,25	44,58	139,66
		60,75	75,74	
		269,51	115,08	
		411,01	55,73	
		350,84	75,81	
		284,11	71,68	
		281,35	51,12	
		120,55	52,02	
		58,72	45,67	
		91,34	70,47	
		114,27	50,98	
		628,1	100,54	
		150,33	110,91	
		563,72	40,75	
		157,18	55,36	
		128,81	62,94	
		172,83	67,12	
		35,52	25,78	
		270,66	65,24	
		341,38	106,42	
		283,7	64,19	
		89,11	68,5	
		59,11	50,9	

		129,55	213,55	
		108,34	46,76	
		177,23	52,99	
		128,3	28,45	
		278,49	43,49	
		54,37	60,89	
		227,45	72,53	
		575,71	85,34	
		83,69	65,79	
		142,67	65,67	
		86,7	61,5	
		156,57	45,4	
		540,59	84,57	
		121,31	61,64	
		152	39,71	
		141,79	44,59	
		173,1	65,24	
		109,17	61,51	
		151,78	46,13	
			63,81	
			75,03	
			54,1	
			57,66	
			67,41	
			67,93	



(Chile)UACH.PV.TR.19	(El Salvador) 70-1169	(El Salvador) 70-1164	(El Salvador) 70-2099	(Costa Rica) G-24NC	(México) MPG-PD-001
123,06	81,6	50,02	186	44,6	213,08
138,09	103,07	47,63	57,65	105,61	199,36
79,37	95,92	151,83	52,19	100,07	174,87
66,14	203,26	135,6	55,39	168,35	170,2
141,3	153,77	85,86	120,52	87,02	186,34
152,12	84,03	52,5	44,58	60,91	127,64
84,2	27,18	89,06	104,48	17,4	85,09
110,02	81,05	105,99	44,31	36,98	130,1
471,74	86,55	191,74	49,35	65,26	96
151,21	93,62	147,69	70,15	33,53	105,37
112,07	167,25	206,71	40,88	37,73	68,73
109,74	85,96	83,04	187,12	79,08	120,43
85,71	89,13	114,59	114,77	97,79	146,98
95,86	80,75	59,64	45,67	36,98	91,43
76,16	219,89	134,75	54,37	39,16	113,14
86,32	58,35	33,51	46,75	63,67	68,57
172,5	39,13	74,76	44,58	27,19	137,14
143,77	213,63	78,26	43,93	67,44	140,55
163,15		60,91	112,89	63,02	55,51
99,22		63,27	45,67	42,05	46,8
221,89		92,17	75,22	39,9	65,28
176,21		133,09	45,53	75,1	54,76
157,01		204,14	166,54	95,68	87,01
117,43		54,32	105,47	79,38	51,52
133,35		144,38	46,78	94,94	52,27
133,41		90,98	79,65	71,87	71,87
80,53		56,4	78,29	27,87	57,66
58,43		173,81	60,92	63,06	35,93
121,78		127,46	59,8	41,77	50,83
67,41		81,5	48,17	40,75	40,48
58,03		70,7	37,85	38,44	84,94
94,73		122,26	82,3	48,74	93,28
116,07		100,89	51,66	45,7	62,29
145,92		86,1	34,05	72,96	155,91
153,31		62,45	48,44	33,73	78,69
		65,16	46,13	46,79	101,64
		63,99	49,07	33,73	45,9
		36,98	69,69	30,47	75,41
		72,88	43,49	273,5	114,75
		126,13	21,38	63,11	59,02
		58,86	34,78	18,13	52,46
		53,69	44,96	57,55	45,9
		62,33	69,8	39,92	92,65
		86,99	40,22	38,87	72,13
		74,96	59,9	54,94	75,41
		145,73		91,08	88,52
		58,07		230,56	91,47
		35,42		58,76	54,45
		51,12		201,25	62,34
				45,96	71,16
				54,38	67,74
				108,85	71,63
				48,95	193,85
				50,03	32,74
				181,15	101,5
				75,05	65,48
				86,16	36,02
				42,42	111,74
				36,98	91,07
				27,25	101,46
				100,14	37,11
				67,44	46,8
				42,37	34,92
				33,72	48,54
				186,22	63,3
				135,87	78,13
				107,68	72,85

				134,28	74,07
				28,15	67,67
				34,36	39,29
				111,41	33,92
				40,24	34,92
				41,96	50,2
				38,07	56,2
				34,7	47,9
				155,31	141,04
				43,07	64,84
				22,1	99,13
				22,37	42,51
				57,18	185,35
				40,23	56,46
				38,06	54,5
				57,63	132,97
				48,53	69,75
				66,06	55,48
				66,96	97
				58,72	73,99
				74,64	31,21
				33,71	69,75
				32,29	190,16
				225,01	87,21
				57,63	43,68
				46,75	41,4
				90,25	53,06
				70,27	96,17
				47,84	74,32
				35,77	62,43
				65,24	72,13
				75,2	68,76
				203,62	75,31
				97,08	49,69
				64,61	49,51
				32,63	45,7
				56,56	41,1
				67,1	39,29
				54,38	45,84
				66,35	56,75
				35,35	34,92
				42,42	53,48
				30,46	48,13
				53,3	130,9
				38,8	41,47
				34,81	34,66
				72,75	68,2
				110,94	77,66
				28,28	23,98
				45,68	140,6
				30,15	82,83
				54	43,93
				42,95	55,59
				137,96	75,85
				181,57	58,86
				51,12	67,57
				55,74	46,24
				49,99	73,13
				34,74	91,01
				106,59	83,32
				31,99	33,15
				66,66	38,51
				77,12	33,04
				210,67	38,25
				108,73	47,78
				53,11	74,36
				35,16	62,13
				73,94	61,06



				35,88	40,33
				36,97	77,19
				66,63	65,4
				38,44	61,04
				53,05	38,15
				64,58	44,69
				44,01	38,15
				40,23	29,43
				243,49	61,92
				59,78	44,44
				33,83	67,28
				53,82	71,93
				60,42	62,18
				77,56	29,87
				38,31	34,88
				51,05	70,84
				57,49	54,43
				69,1	58,58
				43,99	41,02
				48,93	89,59
				33,36	39,18
				47,84	43,54
				40,75	43,54
				44,58	42,45
				49,81	42,33
				35,33	60,74
				54,37	48,1
				50,02	40,23
				48,93	51,1
				76,89	59,8
				34,79	83,72
				36,83	47,84
				50,02	48,93
				44,58	55,45
				34,33	39,14
				48,44	74,18
				160,92	48,23
				292,63	44,58
				233,42	32,29
				107,37	31,52
				65,17	33,71
				42,43	37,11
				39,17	58,43
				72,9	64,15
				137,52	44,58
				37,87	38,44
				53,54	23,92
				167,43	35,88
				128,46	27,18
				55,41	41,32
				106,26	41,32
				69,64	34,79
				64,86	45,67
				55,49	51,1
				41,35	30,78
				51,14	46,92
				53,32	50,02
				56,45	45,67
				71,06	32,58
				53,32	33,71
				87,05	60,3
					48,2
					50,03
					118,52
					43,49
					49,87
					60,63
					50,02

					38,42
					60,89
					50,74
					40,23
					41,32
					63,85
					93,13
					52,76
					36,96
					55,81
					43,29



Tabla A.III.7- Medidas de la distancia entre los canales de Havers. Medidas en

μ.

(Chile)MUSA1637	(Chile)SGO-11	(Chile) s/n	(Chile)GEOUACH126	(Chile)SGO-244C
200,11	344,98	376,16	433,89	323,53
242,11	357,58	312,15	412,84	514,96
578,15	341,89	333,07	419,54	806,34
582,51	472,79	345,03	480,69	576,52
813,58	223,84	372,28	389,9	258,54
256,51	330,25	283,25	476,19	387,2
731,63	300,53	423,43	444,48	328,54
555,1	296,27	326,2	392,39	96,08
867,76	239,46	413,71	560,13	426,16
656,14	408,49	362,14	210,85	620,92
763,61	393,44	261,69	201,7	265,73
520,5	286,61	501,46	626,5	300,61
630,63	249,49	516,14	516,37	364,15
924,78	431,63	424,51	355,9	602,44
413,35	368,27	528,4	482,19	319,84
601,64	377,74	380,77	315,65	376,01
613,78	551,58	417,24	576,92	247,26
409,62	289,51	454,12	739,04	343,26
466,61	533,29	390,63	445,74	352,72
327,96	326,26	357,7	752,07	366,01
516,41	223,34	434,15	397,23	533,26
671,11	175,21	321,02	307,58	295,38
505,94	189,81	336,79	382,15	190,01
354,85	122,79	375,48	449,24	392,12
595,37	237,05	449,4	410,48	554,77
442,18	239,55	306,69	178,87	371,49
601,57	271,9	456,5	317,15	364,06
488,42	282,42	486,21	338,33	544,05
529,59	178,7	388,3	433,94	459,58
406,46	358,82	518,05	352,18	216,01
378,42	312,35	305,62	410,14	334,73
247,4	357,15	454,28	644,84	298,77
529,01	316,01	136,11	330,87	426,02
380,53	416,74	437,49	286,96	567,73
485,52	619,54	448,52	268,8	388,49
366,24	309,27	604,24	259,89	346,97
542,79	431,79	784,98	260,01	309,96
616,59	274,18	680,61	279,51	332,31
702,44	328,49	821,47	243,02	377,85
556,13	302,38	378,01	493,65	314,66
352,55	302,24	370,09	315,43	226,18
407,01	373,44	271,9	414,53	299,41
603,5	199,09	427,32	570,63	452,04
374,12	455,74	381,67	744,79	415,82
627,45	390,81	677,11	739,13	422,81
536,91	336,79	211,53	429,67	345,46
393,44	616,78	329,14	379,36	598,22
444,65	390,27	586,26	446,43	355,91
	296,57	285,6	303,64	582,83
	375,79	711,51	269,8	558,86
	233,49	872,71	436,43	255,29
	322,08	543,59	274,18	159,44
	370,56	531,14	412,61	168,77
	331,58	885,73	483,48	365,86
	252,34	555,11	258,75	223,37
	246,87	600,24	538,93	309,46
	219,96	929,43	268,45	283,19
	303,38	913,64	413,35	226,23
	401,16	422,86	253,87	323,59
	255,57	648,5	442,54	288,4
	283,97	747,25	436,97	303,99



	212,95	637,7	485,26	216,5
	233,28	420,03	434,28	208,41
	198,1	396,71	347,01	249,28
	275,86	648,92	566,84	307,06
	446,46	828,88	230,86	353,82
	409,1	1393,22	226,8	204,36
	243,26	489,44	259,1	329,52
	358,18	372,09	268,99	454,87
	377,17	297,38	505,7	417,23
	402,69	217,31	331,41	343,52
	403,28	432,07	332,18	573,89
	246,35	626,74	283,42	443,5
	239,11	357,36	424,53	720,72
	347,48	443,88	389,37	467,6
	369,57	715,73	335,29	664,14
	363,39	307,22	544,66	390,2
	320,74	370,21	257,22	409,98
	363,21	330,73	565,24	636,09
	276,48	321,11	420,69	522,7
	370,53	227,29	272,47	430,59
	299,27	402,93	551,43	318,54
	555,03	346,87	473,84	494,84
	347,66	301,97	474,61	301,23
	191,34	316,79	543,06	232,24
	374,02	267,59	528,48	325,58
	358,3	284,66	323,53	305,34
	470,2	326,89	401,77	371,84
	230,21	366,31	430,69	443,82
	370,74	232,6	542,17	481,12
	422,5	228,07	320,55	325,74
	235,14	454,14	591,39	592,29
	365,51	347,09	452,49	
	453,07	432,11	394,59	
	215,55	522,5	627,39	
	395,73	672,84	467,69	
	523,65	522,09	356,09	
	305,7	553,35	544,63	
	526,76	382,13	556,07	
	288,96	356,5	770,27	
	328,2	415,76	432,6	
	316,9	593,88	451,66	
	249,5	554,96	614,14	
	369,59	381,67	677,12	
	357,55	749,32	409,81	
	315,4	380,68	639,45	
	218,82	744,85	488,57	
	254,22	633,04	681,07	
	274,96	735,01	607,52	
	313,22	528,78	300,49	
	269,8	423,57	560,76	
	192,71	753,95	404,6	
	283,55	407,57	457,84	
	236,33	851,76	578,29	
	417,09	292,94	474,88	
	307,25	268,99	587,89	
	313,64	332,18	740,84	
	370,45	374,83	480,22	
	249,49	490	266,96	
	328,44	382,92	381,04	
	310,5	429,31	416,78	
	322,42	379,19	363,59	
	288,62	459,75	507,72	
	332,72	308,56	479,95	
	251,26	206,43	585,5	
	239,39	460,51	566,83	
	318,82	668,96	841,92	
	200,9	411,22	678,77	
	288,77	425,86	353,51	



	214,42	385,53	231,39	
	153,87	521,14	422,11	
	267,72	602,47	275,42	
	336,38	356,09	310,15	
	409,05	579,95	296,54	
	350,87	668,59	315,4	
	331,39	421,45	222,32	
	339,53	489,97	356,21	
	528,1	562,32	317,28	
	581,41	1037,01	290,46	
	526,08	774,09	246,96	
	346,84	659,19	193,78	
	388,39	743,67	94,6	
	281,55	770,21	332,99	
	610,83	550,92	267,44	
	228,51	660,75	519,68	
	238,24	498,18	426,17	
	227,92	661,05	404,18	
	355,85	555,91	463,99	
	384,96	597,52	382,31	
	307,56	495	422,11	
	444,1	597,01	334,6	
	215,07	636,4	289,71	
	198,42	322,02	445,66	
	437,02	654,15	371,02	
	330,23	604,05	649,99	
	317,03	1117,8	279,88	
	351,26	532,13	409,43	
	271,35	790,1	458,58	
		924,77	416,74	
		346,02	258,71	
		408,72	290,17	
		450,79	350,01	
		428,11	467,02	
		242,44	504,13	
		260,9	239,55	
		532,51	332,99	
		640,75	350,26	
		568,64	495,35	
		377,16	516,35	
		371,92	388,44	
		482,64	500,32	
		559,32	360,24	
		425,31	405,59	
		308,03	422,22	
		275,73	370,89	
		320,69	215,39	
		183,86	371,49	
		394,06	345,91	
		320,74	286,46	
		359,37	427,77	
		277,5	383,33	
		413,13	588,5	
		350,19	408,53	
		681,82	243,69	
		418,77	248,62	
		455,76	323	
		529,21	391,55	
		812,36	447,85	
		904,28	321,63	
		743,74	599,75	
		575,37	502,44	
		459,06	398,44	
		421,72	234,34	
		493,69	466,54	
		525,05	173,38	
		523,59	149,05	
		459,29	248,42	

	516,64	293,25	
	549,97	318,82	
	469,9	617,75	
	714,19	313,42	
	886,63	321,61	
	554,59	207,36	
	707,64	397,97	
	687,01	356,21	
	502,27	243,78	
	802,28	239,26	
	714,9	280,09	
	516,34	417,95	
	548,07	296,86	
	568,34	466,64	
	979,92	446,4	
	399,44	466,02	
	695,26	445,93	
	689,46	238,15	
	465,03	464,59	
	525,56	353,94	
	987,76	289,88	
	483,38	269,25	
	529,06	355,48	
	726,33	496,44	
	629,31	396,76	
	641,13	293,02	
	961,2	352,49	
	1092,1	390,84	
	1064,01	551,3	
	489,93	579,72	
	634,61	538,24	
	470,63	189,19	
	463,67		
	843,91		
	466,51		
	461,79		
	423,62		
	520,96		
	224,7		
	341,89		
	382,31		
	375,48		
	452,68		
	381,8		
	404,6		
	151,32		
	639,42		
	881,46		
	929,14		
	473,8		
	536,39		



(Chi)UACH.PV.TR.19	(El Salvador) 70-1169	(El Salvador) 70-1164	(El Salvador) 70-2099	(Costa Rica) G-24NC	(México) MPG-PD-001
236,24	760,04	327,52	587,96	397,47	389,47
459,19	484,93	310,32	388,44	228,44	324,13
222,2	1051,12	519,63	461,89	254,14	511,22
319,51	505,38	345,46	291,63	299,51	428,31
292,07	649,36	362,36	408,32	376,73	343,78
226,18	715,16	460,62	559,56	243,25	329,31
347,44	766,64	395,51	418,86	291,06	633,77
525,62	685,05	131,29	353,14	228,42	412,03
310,32	325,02	182,23	275,65	132,02	418,46
496,05	541,65	479,55	291,76	279,96	315,88
466,02	657,34	248,42	494,67	264,39	533,21
368,83	605,87	261,32	390,96	369,25	507,9
438,83	542,87	444,63	465,93	235,3	335,32
654,3	746,17	414,48	417,53	264,71	312,35
531,88	851,14	181,79	336,24	268,23	158,75
494,38	1020,9	430,59	359,35	307,84	259,87
504,88	264,21	286,4	272,53	401,9	295,34
921,04	443,64	350,01	405,5	280,93	433
232,09	543,54	368,66	361,39	229,28	420,26
739,67	524,69	487,61	176,63	251,26	539,06
791,53	474,69	341,89	475,01	175,42	422,3
717,19	274,02	488,26	381,08	296,37	265,6
795,07	280,15	473,54	422,11	273,5	341,68
447,66	294,39	491,43	473,27	82,36	400,14
405,79	858,09	629,87	130,56	86,15	429
331,49	454,12	383,04	131,49	115,37	451,37
637,91	1011,41	626,47	380,88	148,14	430,08
500,09	600,57	806,36	293,58	186,02	304,65
807,2	913,75	526,48	271,39	259,82	393,05
804,48	1104,26	587,96	117,88	187,39	474,28
1106,62	387,13	525,42	549,19	254,12	456,55
873,39	367,85	422,02	448,14	306,96	150,98
991,05	352,55	493,69	131,98	232,6	528,64
1136,02	316,46	702,08	322,95	333,54	291,25
238,74	411,42	310,32	189,22	399,32	533,45
389,39	631,72	601,17	189,14	421,75	533,41
291,86	798,92	1028,04	437,7	278,82	379,29
465,66	421,61	638,75	353,09	405,53	619,83
462,05	628,54	478,71	328,05	349,53	358,23
552,85	842,92	378,77	397,72	191,63	347,96
526,34	314,74	430,49	579,69	121,44	536,75
658,67	393,92	395,49	279,18	205,81	337,49
389,39	371,12	423,26	238,33	178,64	363,07
373,9	541,24	594,37	442,1	122,31	317,15
324,02		309,65	286,05	247,76	425,7
316,32		450,88	356,63	279,96	372,83
316,84		530,32	114,73	275,84	249,58
291,59		608,24	385,66	325,03	315,46
326,9		456,28	552,9	221,91	244,14
647,65		240,16	587,53	325,41	181,53
352,65		528,27	242,46	346,23	326,43
611,56		418,49	413,65	282,61	231
723,03		382,38	348,68	444,89	238,21
797,72		488,3	555,49	323,46	307,74
926,92		296,24	307,13	279,96	179,79
196,06		394,08	318,84	173,96	248,04
201,07		731,05	359,05	317,48	286,36
228		421,33	439,16	384,66	367,19
488,92		514,62	624,57	367,82	458,71
458,53		377,69	445,89	251,79	649,83
415,73		465,25	494,63	344	469,17
321,72		372,01	555,28	286,58	279,92
218,65		677,34	449,09	297,66	460,51
248,77		395,64	427,22	425,02	104,35
623,41		144,5	440,56	286,89	326,64
603,89		483,21	279,56	376,6	327,38
517,72		477,37	401,22	372,65	469,78



502,32		506,54	189,45	291,29	413,09
612,71		365,7	246,12	182,41	501,91
352,2		386,78	418,81	338,51	382,5
665,96		412,66	350,87	324,69	264,27
476,51		339,19	342,9	252,53	423,06
207,41		380	362,49	372,92	298,14
322,67		322,12	480,66	341,5	365,13
147,45		489,24	440,38	437,52	311,22
238,56		583,76	305,79	274,27	344,4
414,1		515,16	472,66	523,16	139,8
469,99		433,14	300,17	297,23	331,55
554,72		191,22	141,21	499,16	418,29
452,01		481,01	347,24	450,32	165,92
665,24		261,13	463,35	283,51	314
613,3		514,54	408,32	417,29	98,58
358,4		534,71	459,06	253,79	389,67
319,78		310,88	507,55	502,92	401,58
434		341,99	356,81	367,1	337
530,39		544,02	429,6	490,26	492,12
825,66		510,8	535,32	173,65	333,86
672,7		280,93	651,25	462,53	341,94
502,9		268,8	339,45	385,88	334,81
328,55		336,35	224,13	302,71	356,74
318,09		424,81	322,26	617,07	405,92
792,24		162,11	394,82	300,47	569,28
455,98		226,87	474,95	496,21	400,47
497,16		442,69	398,36	382,15	275,13
311,6		521,33	329,85	231,97	194,09
344,06		704,83	277,57	226,58	249,07
633,36		335,21	409,05	221,67	444,39
765,83		424,31	452,62	513,13	259,89
515,86		533,04	422,5	638,75	200,79
409,62		790,75	118,74	640,49	383,48
648,87		440,85	328,54	606,95	159,3
489,57		1112,44	307,13	454,11	483,89
305,9		441,29	357,7	295,22	156,16
809,77		495,99	312,08	223,3	451,16
828,93		430,75	290,92	91,46	561,56
180,44		297,1	329,61	202,8	327,46
299,05		566,33	506,78	255,4	413,74
159,04		492,04	427,07	345,97	381,49
218,65		448,09	277,56	550,9	352,92
447,89		323,46	126	179,53	440,77
497,16		420,53	302,71	382,06	367,95
683,02		369,9	193,97	309,84	312,77
332,66		572,89	339,39	348,78	200,69
312,55		389,5	104,38	280,28	209,65
326,49		505,77	278,67	303,76	355,51
416,33		541,85	156,34	363,4	193,84
287,44		538,63	154,18	251,91	376,66
347,79		634,95	213,3	211,8	166,98
776,44		352,67	258,44	388,49	313,57
608,7		262,6	277,56	441,1	340,66
353,65		439,22	590,99	425,52	176,32
258,36		359,37	483,31	285,03	310,64
286,46		134,38	280,93	555,23	328,89
586,66		221,84	147,62	657,27	334,55
282,91		454,4	170,28	122,7	354,84
433,24		421,25	491,62	258,39	332,89
400,57		505,18	392,79	284,06	191,87
364,25		334,65	152,79	609,6	297,95
449,85		317,47	458,75	263,67	252,14
662,21		459,29	318,31	209,01	394,92
608,95		205,53	377,26	422,85	380,4
597,62		384,97	186,75	409,08	366,16
376,54		415,55		371,62	410,32
244,04		371,92		351,56	260,07
436,78		406,23		603,34	385,09



468,37		469,77		705,8	236,11
516,69		321,02		347,05	301,3
237,48		548,98		437,27	243,81
479,42		291,21		330,36	305,14
312,23		425,45		109,06	180,35
523,64		445,08		390,33	428,21
538,65		669,57		380,68	141,4
519,11		970,46		254,48	273,02
708,52		587,58		193,07	464,95
255,13		863,94		373,38	254,82
496,21		538,36		296,8	260,95
464,71		856,16		336,1	290,8
394,83		427,28		390,49	384,35
669,7		254,19		224,77	415,21
189,96		361,73		246,83	371,43
496,86		236,77		284,94	359,46
537,89		299,16		486,74	216,2
246,9		353,26		287,91	576,15
564,52		386,53		240,89	483,53
246,21		360,42		453,43	246
511,01		443,6		494,03	199,08
222,75		287,04		287,23	255,75
479,58		323,56		228,44	269,86
309,99		171,24		106,14	267,22
461,03		334,76		278,26	269,62
364,31		413,33		268,55	260,71
546,27		519,41		415,27	426,85
		285,09		544,93	351,25
		349,17		228,51	291,89
		136,31		169,59	375,34
		302,32		217,09	403,39
		392,68		239,01	270,74
		499,77		255,48	525,3
		271,62		436,49	291,36
		347,87		133,31	330,83
		485,51		323,16	460,77
		462,63		287,23	182,67
		676,24		262,77	300,98
		304,06		427,05	218,59
		254,22		548,98	305,33
		333,31		464,09	224,28
		267,5		271,99	375,55
		371,99		322,43	199,78
		417,65		528,04	296,09
		191,79		245,43	285,67
		339,28		264,39	202,83
		123,78		232,32	429,12
		384,25		256,96	414,27
		309,63		471,54	317,23
		399,22		144,5	190,49
		301,27		326,86	408,22
		400,28		217,09	415,87
		409,72		428,07	416,49
		594,25		370,59	140,98
		535,69		194,31	123,18
		370,26		414,86	175,57
		347,81		303,19	454,98
		533,94		207,23	336,72
		487,16		410,19	452,33
		444,99		416,41	372,23
		362,36		307,01	323,61
		378,73		485,09	430,48
		287,83		539,4	303
		322,01		143,02	569,13
		172,88		432,5	228,87
		357,15		239,34	188,03
		496,21		292,33	330,42
		235,68		412,36	298,42

	350,19	450,28	293,78
	535,77	509,75	162,46
	371,15	67,19	288,69
	403,59	217,45	406,85
	446,57	194,75	394,77
	441	262,39	449,15
	525,52	395,7	348,92
	495,92	181,01	402,42
	746,61	239,34	204,63
	675,65	315,78	236,31
	611,66	345,58	273,4
	433,88	441,92	349,47
	660,05	267,75	230,51
	242,37	321,13	63,56
		300,22	355,98
		326,26	288,56
		163,97	212,62
		270,36	254,56
		263,08	75,11
		511,59	102,2
		388,62	212,17
		174,9	281,17
		216,08	185,01
		321,79	202,57
		394,95	296,77
		446,58	324,15
		352,55	355,12
		317,66	307,74
		312,61	286,97
		218,14	388,64
		372,05	210,73
		166,19	97,62
		152,28	355,89
		201,71	409,55
		307,93	316,34
		491,5	282,71
		222,7	189,93
		159,12	289,84
		231,15	93,91
		246,14	305,05
		250,15	194,97
		294,49	207,26
		319,13	260,12
		292,68	255,44
		245,27	322,53
		204,54	292,88
		209,24	461,07
		192,77	255,48
		307,22	291,45
		300,1	455,93
		341,99	525,37
		227,67	490,81
		367,44	348,12
		144,54	294,04
		446,95	476,08
		420,43	271,91
		536,82	462,19
		407,17	684,39
		355,45	323,82
		314,1	324,23
		321,13	343,07
		232,99	254,71
		292,62	251,52
		417,37	255,56
		455,91	345,25
		423,76	319,6
		634,86	379,02
		327,35	274,23



			559,4	187,78
			529,63	406,94
			490,55	289,41
			469,53	260,35
			392,57	350,05
			635,76	287,76
			613,47	268,12
			241,4	360,87
			305,08	389,43
			506,32	142,82
			590,98	275,61
			332,53	223,8
			604,76	246,25
			348,03	381,61
			205,54	406,11
			270,16	377,17
			359,54	293,64
			352,25	387,34
			638,33	390,75
			251,85	580,55
			267,29	476
			274,27	336,4
			266,35	633,02
			251,36	283,43
			308,72	417,67
			430,01	499,46
			98,41	246,3
			201,54	383,62
			225,11	323,77
			277,46	304
			224,85	327,76
			577,05	210,89
			479,88	279,85
			395,78	466,2
			200,26	282,36
			227,96	218,12
			366,55	164,3
			143,96	325,57
			417,06	259,63
			226,95	430,78
			470,64	144,35
			259,54	282,13
			277,46	266,2
			290,97	468,13
			526,34	272,98
			422,61	304,58
			407,51	361,42
			321,22	429,35
			455,13	256,38
			534,1	331,02
			469,01	305,65
			291,17	315,75
			443,98	244,36
			416,45	212,16
			428,65	268,24
			415,02	275,05
			451,42	290,12
			425,16	203,91
			473,71	274,83
			213,85	184,3
			303,73	176,99
			326,37	302,25
			352,91	303,96
			382,13	246,71
			325,46	266,84
			356,38	333,79
				261,74
				228,63

				284,22
				211,93
				262,88
				229,19
				194,49
				240,12
				376,86
				376,7
				457,87
				223,73
				331,02
				387,5
				236,24
				267,92
				390,43
				291,01
				226,28
				213,96
				358,93
				342,7
				287,48
				429,38
				287,76
				336,8
				330,91
				235,31
				249,41
				174,07
				215,63
				254,99
				372,37
				136,44
				228,78
				227,03
				141,47
				236,23
				343,35
				342,84
				420,36
				380,31
				193,40
				306,33
				432,66
				338,29
				364,09
				313,18
				317,14
				314,24
				174,95
				173,65
				196,49
				161,45
				280,52
				391,56
				305,88
				335,66
				129,17
				330,35
				346,69
				333,2
				435,97
				332,15
				315,83
				343,26
				458,17
				654,2
				344,67
				385,72

					252,48
					361,41
					236,51
					202,74
					353,47
					315,59
					185,8
					247,95
					147,62
					168,9
					185,04
					156,82